

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRENO MAURÍCIO MARSON

SÍNTESE DE COPOLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PLA-*b*-PEG E PLA-*b*-PEG-
FOLATO E DESENVOLVIMENTO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ÁLCOOL PERÍLICO

CURITIBA

2019

BRENO MAURÍCIO MARSON

SÍNTESE DE COPOLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PLA-*b*-PEG E PLA-*b*-PEG-
FOLATO E DESENVOLVIMENTO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ÁLCOOL PERÍLICO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Coorientador: Dr. Guilherme Fadel Picheth

CURITIBA

2019

Marson, Breno Maurício

Síntese de copolímeros biodegradáveis PLA-b-PEG e PLA-b-PEG-folato e desenvolvimento de micro e nanopartículas poliméricas contendo álcool perílico [recurso eletrônico] / Breno Maurício Marson – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

1. PLA-b-PEG. 2. Polimerização. 3. Microcápsulas. 4. Nanocápsulas.
5. Emulsificação-evaporação. 6. Antitumoral. I. Pontarolo, Roberto.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BRENO MAURICIO MARSON** intitulada: **SÍNTESE DE COPOLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PLA-B-PEG E PLA-B-PEG-FOLATO E DESENVOLVIMENTO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁLCOOL PERÍLICO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 17 de Maio de 2019.


ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora


FLAVIA LADA DEGAUT PONTES
Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)


MARCO ANDRÉ CARDOSO
Avaliador Externo (UP)


ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDADE
Avaliador Externo (UFPR)


MARCUS VINICIUS DE LIZ
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho à minha Esposa e Família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde, por iluminar meu caminho e assim possibilitar-me a busca e realização de meus sonhos.

A minha esposa Raquel de Oliveira Vilhena, que tem todo o meu amor, respeito e admiração. Por todo amor, paciência e compreensão. Obrigado por todo o incentivo e apoio durante esses anos, por tornar minha vida mais completa e muito mais feliz.

Aos meus pais, Maurício Marson e Maria Nilze Guerino Marson (*in memorian*), pelo amor incondicional, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

A minhas irmãs Tatiana Guerino Marson e Poliana Guerino Marson, pelo amor e afeto, pela dedicação, apoio e incentivo. Poucas pessoas têm a sorte na vida de terem tão boas referências nas quais se espelhar, graças a vocês posso dizer que sou uma delas.

Ao meu orientador Professor Dr. Roberto Pontarolo, por toda a confiança, compreensão e paciência em mim depositada para a realização desse trabalho. Obrigado pela oportunidade de aprendizado e, principalmente, pelo exemplo como pessoa, profissional e dedicação aos sonhos alheios.

Agradeço em especial ao Dr. Guilherme Fadel Picheth pela coorientação e Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas por todo o tempo, esforço, dedicação e conhecimento transmitido. Agradeço aos demais professores que contribuíram com esse trabalho, Dr. Glaucio Valdameri, Dr. Giovana G. Nunes, Dr. Najeh M. Khalil, Dr. Fabio Murakami, Dr. Maria Rita Sierakowski. Cada um, em seu momento e forma, fez a diferença em minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado!

Agradeço a todos os amigos e colegas do CEB e do BioPol pelos momentos compartilhados, ensinamentos, risadas e ajuda.

RESUMO

O álcool perílico (POH) é um composto natural que tem atraído interesse devido ao potencial antitumoral. No entanto, estudos clínicos de fase I e II exibiram baixa tolerância após administração na forma oral. Nesse contexto, o uso de nanossistemas pode representar uma alternativa interessante para o carregamento do fármaco, uma vez que além da redução dos efeitos tóxicos em tecidos saudáveis, também possibilita a modulação da liberação, biodistribuição e bioacumulação. No presente trabalho foram sintetizados e caracterizados os copolímeros poli(*D,L*-ácido láctico)-*b*-Poli(etilenoglicol) e poli(*D,L*-ácido láctico)-*b*-Poli(etilenoglicol)-*b*-Folato, adequado para a vetorização ativa de sistemas carreadores de fármacos para células tumorais que superexpressam receptores de folato. Os copolímeros foram obtidos através do método de polimerização por abertura de anel usando *DL*-lactídeo na presença de 2-etil-hexanoato de estanho como catalizador e polietilenoglicol (5.000 g mol^{-1}) como iniciador da reação. Os copolímeros foram caracterizados por RMN de ^1H , GPC, DSC, FT-IR e UV-Vis. Microcápsulas contendo POH foram obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente, utilizando clorofórmio como solvente orgânico e álcool polivinílico e colato de sódio como tensoativos na fase aquosa. O impacto dos diferentes tensoativos na morfologia e o perfil de liberação cinético foram avaliados, servindo de base para posterior desenvolvimento de nanocápsulas. O colato de sódio a 1,5% se mostrou mais adequado para a obtenção de cápsulas, uma vez que proporcionou uma maior resistência à tensão de cisalhamento do sistema carreador. A eficiência de encapsulação se mostrou alta para a técnica utilizada, visto que o POH é um líquido parcialmente volátil. A liberação *in vitro* foi correlacionada com o modelo cinético de *Baker-Lonsdale*, relacionado à formação de poros pela degradação polimérica. As microcápsulas apresentaram uma CI_{50} equivalente ao POH puro ($80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), após 72 h de tratamento. No entanto, após 24 h de exposição, as micro cápsulas mostraram uma CI_{50} maior ($220 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), sugerindo uma liberação gradual do fármaco. As nanocápsulas contendo POH foram obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente, utilizando clorofórmio como solvente orgânico e colato de sódio como tensoativo na fase aquosa. Sistemas esféricos foram obtidos e caracterizados por DLS ($D_h \approx 172 \text{ nm}$, $\text{IP} \approx 0,13$), potencial zeta (-18 a -20 mV) e microscopia de transmissão. Os resultados demonstram que o POH tem potencial para ser incorporado em sistemas poliméricos, como forma de melhorar a terapêutica e diminuir a toxicidade *in vivo* associada ao uso oral. Há perspectivas de formular e caracterizar nanocápsulas recobertas com folato, contendo o fármaco, e avaliar do potencial de internalização celular em modelos *in vitro* com células que superexpressam receptores, assim como comparar a biodisponibilidade relativa através de estudos de pré-farmacocinética *in vivo*, uma vez que o POH puro tem baixíssima biodisponibilidade.

Palavras-chave: PLA-*b*-PEG. Polimerização. Microcápsulas. Nanocápsulas. Emulsificação-evaporação. Antitumoral.

ABSTRACT

Perillyl alcohol is a natural compound that has attracted interest due to its potent antitumor activity. However, clinical trials have exhibited poor tolerance by oral administration, mainly due to gastrointestinal side-effects. The delivery of such drug in biodegradable nanosystems may represent an interesting alternative. Additionally, to the reduction of systemic toxic effects, the nanoencapsulation it also allows the modulation of the release, biodistribution and bioaccumulation. In the present work, PLA-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG-FOLATO copolymers were synthesized and characterized, showing potential to active targeting of nano based drug delivery systems to tumor cells that overexpress folate receptors. The copolymers were obtained by the ROP method using *DL*-lactide in the presence of tin(II) 2-ethylhexanoate as the catalyst, polyethylene glycol (*M_n* 5,000) as reaction initiator. Through coupling reaction with EDC and NHS, the folate was adequately conjugated to the copolymer. Copolymers characterization were carried out by ¹H-NMR, GPC, DSC, FT-IR and UV-vis. Microcapsules containing the perillyl alcohol were formulated by the solvent emulsification-evaporation method, using chloroform as organic solvent and PVAI or sodium cholate as surfactants in the aqueous phase. The impact of the different surfactants on the morphology and kinetic release profile were evaluated, serving as the basis for the development of nanocapsules. Sodium colate at 1.5% concentration proved to be more suitable for capsule production since it provided a higher shear stress resistance of the carrier system. The efficiency of encapsulation was high, since the POH is liquid and partially volatile. The *in vitro* release profile of the drug from the microcapsules was correlated with pore formation and polymer degradation, best fitted to the Baker-Lonsdale model. The microcapsules showed an IC₅₀ equivalent to that of the free drug (80 µg mL⁻¹) after 72 h of exposure. However, after 24 h of exposure, loaded microcapsules showed an IC₅₀ almost two-fold higher (220 µg mL⁻¹) suggesting gradual release. he nanocapsules were obtained by the same technique used to microcapsules, however with additional ultrasound energy. Sodium cholate at 1.5 % was used as the surfactant in the aqueous phase. Spherical systems were obtained and characterized by DLS (*D_n* ≈ 172 nm, IP ≈ 0.13), zeta potential (-18 to - 20 mV), and TEM. The results demonstrate that perillyl alcohol has the potential to be incorporated into polymeric systems to improve therapy and decrease *in vivo* toxicity associated with oral use. Since encapsulation can alter bioaccumulation, there are prospects for formulate and characterize folate-coated nanocapsules contain perillyl alcohol, as well as, evaluating its cell internalization potential by *in vitro* models with cells that overexpress receptors. As well as, compare the relative bioavailability by pre-pharmacokinetics studies since the perillyl alcohol bioavailability is low.

Keywords: Polymerization. Microcapsules. Nanocapsules. Emulsification-evaporation. Antitumoral.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOESFERAS E NANOCÁPSULAS.....	29
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MICELAS, LIPOSSOMAS E DENDRÍMEROS.....	31
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LIMONENO	32
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁLCOOL PERÍLICO	32
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA (EPR) NO TECIDO TUMORAL	36
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TÉCNICAS MAIS UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	41
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE	44
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI(ÁCIDO LÁTICO), ONDE N REPRESENTA O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS DO MONÔMERO LÁTICO	48
FIGURA 9 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEREOISÔMEROS DO DÍMERO CÍCLICO DO ÁCIDO LÁTICO	49
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE POLIMERIZAÇÃO POR INSERÇÃO POR COORDENAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL DO LACTÍDEO, NA PRESENÇA DE $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ COMO CATALISADOR E UM ÁLCOOL COMO INICIADOR	50
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE ENTRE GRUPAMENTO CARBOXÍLICO E EDC/NHS FORMANDO INTERMEDIÁRIOS REATIVOS O-ACILISOURÉIA SEGUIDO DE SULFO-NHS ÉSTER. NA PRESENÇA DE NUCLEÓFILO (AMINA PRIMÁRIA) OCORRE ATAQUE NUCLEOFÍLICO FORMANDO LIGAÇÃO AMIDA, LIBERANDO NHS	56

FIGURA 12 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PLA- <i>B</i> -PEGNH ₂ , FOLATO E REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO NA PRESENÇA DE EDC/NHS.....	57
FIGURA 13 - CROMATOGRAMAS DE CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC). (A) COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG, (B) COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO	90
FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG (A) ANTES DA PURIFICAÇÃO E (B) APÓS PURIFICAÇÃO.....	92
FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEGNH ₂ (A) ANTES DA PURIFICAÇÃO E (B) APÓS PURIFICAÇÃO.....	93
FIGURA 16 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO COPOLÍMERO (A) PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO, (B) PLA- <i>B</i> -PEGNH ₂ E (C) PLA- <i>B</i> -PEG.....	95
FIGURA 17 - CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC). (A) PLA- <i>B</i> -PEG E (B) PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO	97
FIGURA 18 - ESPECTROS ADQUIRIDOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA O COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG (VERMELHO), COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO (AZUL) E FOLATO PURO (PRETO).....	99
FIGURA 19 – ESPECTRO ADQUIRIDO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA O FOLATO PURO	99
FIGURA 20 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA COM FOLATO. (A) FOLATO LIVRE, (B) PLA- <i>B</i> -PEG (COR PRETA); PLA- <i>B</i> -PEGNH ₂ , (COR VERMELHA) PLA- <i>B</i> -PEG-FOLATO (COR AZUL) E (C) CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA COM FOLATO	100
FIGURA 21 - CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES SUBMETIDAS ÀS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO.....	104
FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES (A) AMOSTRA CONTROLE, CONDIÇÕES (B) BÁSICA E (C) ÁCIDA, APÓS 36 HORAS ...	105

FIGURA 23 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO OBTIDOS PARA A TRIPLICATA DE CURVAS DE CALIBRAÇÃO, RESPECTIVAS EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO	111
FIGURA 24 - GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS OBSERVADOS PARA A TRIPLICATA DE CURVA DE CALIBRAÇÃO	113
FIGURA 25 - MEDIDAS DA TENSÃO INTERFACIAL (MN M^{-1}) DE ACORDO COM O LOG DA CONCENTRAÇÃO (MMOL L^{-1}) E CONCENTRAÇÃO PERCENTUAL DOS SURFACTANTES ÁLCOOL POLIVINÍLICO (PVAL) E COLATO DE SÓDIO (SC).....	121
FIGURA 26 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA A LASER CONFOCAL OBTIDAS PARA AS MICROCÁPSULAS FORMULADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SURFACTANTES	124
FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL MORFOLÓGICO GERADO COM SURFACTANTE COLATO DE SÓDIO A 1,5% E ÁLCOOL POLIVINÍLICO A 1,0%, ANTES E DEPOIS DO PROCESSO DE CENTRIFUGAÇÃO	126
FIGURA 28 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ÁLCOOL PERÍLICO PARA AS MICROPARTICULAS DE PLA- <i>B</i> -PEG PREPARADAS COM COLATO DE SÓDIO E ÁLCOOL POLIVINILICO E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO	128
FIGURA 29 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA A LASER CONFOCAL DAS MICROCÁPSULAS FORMULADAS COM SURFACTANTES COLATO DE SÓDIO E ÁLCOOL POLIVINÍLICO, OBTIDAS EM DIFERENTES TEMPOS DE LIBERAÇÃO	130
FIGURA 30 - PERFIL DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS HEK-293 PARA MICROCÁPSULAS COM E SEM ÁLCOOL PERÍLICO E FÁRMACO LIVRE. (A) 24 HORAS DE TRATAMENTO; (B) 72 HORAS DE TRATAMENTO.	133
FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOCÁPSULAS DE PLA- <i>B</i> -PEG CONTENDO O ÁLCOOL PERÍLICO,	

ANTES (A) E APÓS (B) FILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 0,45 μ M DE TAMANHO DE PORO.....	136
---	-----

FIGURA 32 - ELETROMICROGRAFIAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA NANOCÁPSULAS DE PLA- <i>B</i> -PEG SEM ÁLCOOL PERÍLICO (A) E COM ÁLCOOL PERÍLICO (B)	137
--	-----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS EM NANOPARTÍCULAS PARA QUE OCORRA O EFEITO EPR	38
QUADRO 2 - EXEMPLOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE, UTILIZANDO O COPOLÍMERO PLA- <i>B</i> -PEG	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DE RELAÇÕES MOLARES ENTRE MONÔMERO E INICIADOR UTILIZADOS NA POLIMERIZAÇÃO, MASSA MOLAR ESPERADA, MASSAS MOLARES E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) DOS COPOLÍMEROS SINTETIZADOS OBTIDOS POR MEIO DO GPC.....	90
TABELA 2 - TEMPOS DE RETENÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADO PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO E RESOLUÇÃO ENTRE PICOS	107
TABELA 3 - RESULTADOS OBSERVADOS NA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÃO ANALÍTICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES LABORATORIAIS	108
TABELA 4 - DADOS DE RESOLUÇÃO ENTRE PICOS E PUREZA DE PICO PARA O ÁLCOOL PERÍLICO PARA AS AMOSTRAS SUBMETIDAS ÀS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO.....	109
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO PARALELISMO ENTRE COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS PARA AS CURVAS ANALÍTICA DE PADRÃO DE POH E AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO	110
TABELA 6 - DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA AS AMOSTRAS DA REPETIBILIDADE	114
TABELA 7 - DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA AS AMOSTRAS DA PRECISÃO E AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	115
TABELA 8 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE EXATIDÃO	115
TABELA 9 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA O ALCOOL PERILICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS NA ROBUSTEZ	116
TABELA 10 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FLUXO 0,34 ML MIN ⁻¹	117

TABELA 11 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FLUXO 0,36 ML MIN ⁻¹	117
TABELA 12 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FORNO A 23°C	118
TABELA 13 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FORNO A 28°C	118
TABELA 14 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE 34% DE ACN NA FASE MÓVEL	118
TABELA 15 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE 36% DE ACN NA FASE MÓVEL	119
TABELA 16 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE DIFERENTE LOTE DE COLUNA	119
TABELA 17 - VALORES DE EXCESSO SUPERFICIAL MÁXIMO, ÁREA MÍNIMA OCUPADA POR MOLÉCULA DE SURFACTANTE E PRESSÃO SUPERFICIAL NA INTERFACE CLOROFÓRMIO/ÁGUA PARA O ÁLCOOL POLIVINILICO E COLATO DE SÓDIO	122
TABELA 18 - MEDIDAS DE TENSÃO INTERFACIAL ENTRE FASES CLOROFÓRMIO/ÁGUA CONTENDO SURFACTANTES COLATO DE SÓDIO 1,5%, ÁLCOOL POLIVINILICO 1,0%, PLA- <i>B</i> -PEG E ÁLCOOL PERÍLICO ...	123
TABELA 19 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO, CAPACIDADE DE CARGA DE FÁRMACO E DIÂMETRO MÉDIO PARA AS MICROCÁPSULAS OBTIDAS COM 1,5% DE COLATO DE SÓDIO E 1,0% DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO ...	127
TABELA 20 – CORRELAÇÃO DOS MODELOS CINÉTICOS DE ORDEM ZERO, PRIMEIRA ORDEM, HIGUCHI E BAKER-LONSDALE PARA AS MICROCÁPSULAS DE PLA- <i>B</i> -PEG CONTENDO ÁLCOOL PERÍLICO.....	131

TABELA 21 - VALORES DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLA-*B*-PEG CONTENDO OU NÃO O ÁLCOOL PERÍLICO..... 135

TABELA 22 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E CAPACIDADE DE CARGA DE ÁLCOOL PERÍLICO, POR DETERMINAÇÃO DIRETA E INDIRETA, PARA NANOCÁPSULAS DE PLA-*B*-PEG..... 137

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RENDIMENTO	62
EQUAÇÃO 2 - DETERMINAÇÃO DA EFICIENCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FORMA DIRETA	63
EQUAÇÃO 3 - DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE CARGA.....	63
EQUAÇÃO 4 - DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FORMA INDIRETA.....	64
EQUAÇÃO 5 - CÁLCULO DO EXCESSO SUPERFICIAL MÁXIMO NA INTERFACE	79
EQUAÇÃO 6 - ÁREA MÍNIMA OCUPADA POR UMA MOLÉCULA DE SURFACTANTE.....	79
EQUAÇÃO 7 - PRESSÃO SUPERFICIAL NA INTERFACE	80
EQUAÇÃO 8 - ENERGIA LIVRE DE DESSORÇÃO DA INTERFACE.....	126

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	- Deslocamento químico
ζ	- Potencial zeta
γ	- Tensão interfacial/superficial
Γ_{max}	- Excesso superficial máximo
a_{min}	- Área mínima ocupada por uma molécula de surfactante
π_{CMC}	- Pressão superficial na interface
ACN	- Acetonitrila
AFM	- <i>Atomic force microscopy</i> (Microscopia de força atômica)
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCG	- <i>Bacillus Calmette Guéres</i>
CAC	- Concentração de agregação crítica
CHCl_3	- Clorofórmio
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CLSM	- <i>Confocal laser scanning microscopy</i> (Microscopia de varredura a laser confocal)
CMC	- Concentração micelar crítica
d	- Densidade
DAD	- <i>Diodo array detector</i> (detector de arranjo de diodos)
DHPA	- Ácido dihidroperílico
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP _n	- Grau de polimerização numérico médio
DSC	- <i>Differential scanning calorimetry</i> (Calorimetria exploratória diferencial)
EDC	- Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDS	- <i>Energy dispersive spectroscopy</i> (espectroscopia de energia dispersiva de raios X)
EE	- Eficiência de encapsulação

EPR	- <i>Enhanced permeability and retention</i> (Permeabilidade e retenção aumentada)
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	- <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)
GPC	- <i>Gel permeation chromatography</i> (Cromatografia de permeação em gel)
ICH	- <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	- Insumo farmacêutico ativo
IP	- Índice de polidispersão
LC	- Capacidade de carga
MC	- Micropartícula
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
M_n	- Massa molar numérica média
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
M_w	- Massa molar ponderal média
NHS	- N-hidroxissulfosuccinimida
NP	- Nanopartículas
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA	- Ácido perílico
PBS	- Tampão fosfato de potássio
PCL	- ω -caprolactona
PD	- Produto de degradação
PDLA	- Poli(<i>D</i> -lactídeo)
PDLLA	- Poli(<i>D,L</i> -lactídeo)
PE	- Ponto de ebulição
PEG	- Polietilenoglicol
PHB	- Poli(α -hidroxibutirato)
PLA	- Poli(lactídeo)
PLA- <i>b</i> -PEG	- Poli(<i>D,L</i> -ácido láctico)- <i>b</i> -Poli(etileno glicol)
PLA- <i>b</i> -PEG-Folato	- Poli(<i>D,L</i> -ácido láctico)- <i>b</i> -Poli(etileno glicol)- <i>b</i> -Folato

PLA- <i>b</i> -PEGNH ₂	- Poli(<i>D,L</i> -ácido láctico)- <i>b</i> -Poli(etileno glicol) com grupamento amina em posição terminal no bloco PEG
PLGA	- Poli(lactídeo-co-glicolídeo)
PLLA	- Poli(<i>L</i> -lactídeo)
POH	- Álcool perílico
PVAI	- Álcool poli vinílico
Q-Tof	- <i>Quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas por tempo de voo)
RES	- <i>Reticuloendothelial system</i> (Sistema reticulo endotelial)
RI	- <i>Refractive index</i> (Índice de refração)
RMN de ¹ H	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROP	- <i>Ring-opening polymerization</i> (polimerização por abertura de anel)
Rs	- Resolução
SC	- Colato de sódio
Sn(Oct) ₂	- 2-etil-hexanoato de estanho II
T _c	- Temperatura de cristalização
T _{fus}	- Temperatura de fusão
T _g	- Transição vítrea
TMS	- Trimetilsilano
tr	- Tempo de retenção
UPLC	- <i>Ultra performance/pressure liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra eficiência)
UV-Vis	- Espectrofotometria no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.1.1 Objetivos específicos	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 CÂNCER.....	25
3.2 NANOMEDICINA.....	27
3.2.1 Nanopartículas poliméricas.....	28
3.3 ALCOOL PERILÍCO.....	31
3.4 DELINEAMENTO DE NANOSSISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS.....	34
3.4.1 Influência do microambiente tumoral no delineamento de nanopartículas poliméricas	35
3.4.2 Outros fatores que contribuem no delineamento de nanopartículas poliméricas	37
3.5 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS... ..	40
3.6 POLÍMEROS UTILIZADOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	46
3.6.1 Síntese de copolímeros PLA- <i>b</i> -PEG e PLA- <i>b</i> -PEG-FOLATO	47
3.6.2 Caracterização de copolímeros PLA- <i>b</i> -PEG e PLA- <i>b</i> -PEG-FOLATO ...	57
3.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	59
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 Reagentes e Solventes.....	67
4.2 Consumíveis e equipamentos.....	67
4.3 Síntese polimérica do PLA- <i>b</i> -PEG e PLA- <i>b</i> -PEG-Folato	69

4.4	Caracterização polimérica do PLA- <i>b</i> -PEG e PLA- <i>b</i> -PEG-Folato	71
4.5	Avaliação do álcool perílico	73
4.6	Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para doseamento do álcool perílico	73
4.6.1	Preparo da solução estoque de álcool perílico	73
4.6.2	Obtenção de amostras forçadas à degradação	74
4.6.3	Otimização dos parâmetros cromatográficos	75
4.6.4	Avaliação da estabilidade das soluções analíticas	76
4.6.5	Validação do método analítico por CLAE-DAD	76
4.7	Tensiometria e estudos das propriedades interfaciais	78
4.8	Preparação das micropartículas contendo POH	80
4.9	Eficiência de encapsulação das microcápsulas contendo POH	81
4.9.1	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	81
4.9.2	Análises por Microscopia de varredura a laser confocal (CLSM)	82
4.9.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	83
4.10	Obtenção de nanopartículas contendo álcool perílico	84
4.11	Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1	Síntese e caracterização polimérica	87
5.2	Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD	102
5.2.1	Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade	102
5.2.2	Validação do método analítico por CLAE-DAD	109
5.3	Preparação caracterização de micropartículas contendo POH	119
5.3.1	Propriedades interfaciais	120
5.3.2	Influência do surfactante nas microcápsulas	123
5.3.3	Perfil de liberação <i>in vitro</i> das microcápsulas	126
5.3.4	Estudos de citotoxicidade das microcápsulas de PLA- <i>b</i> -PEG	131

5.4	Preparação e caracterização das nanopartículas contendo POH	133
6	CONCLUSÃO	138
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
	REFERENCIAS.....	140

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda doença que mais causa mortes a nível global. Apesar de diversas técnicas estarem disponíveis para tratamento, inclusive em associação, a eficácia terapêutica dos tratamentos é limitada diante da heterogeneidade da doença (WHO, 2018).

A quimioterapia, uma das técnicas mais utilizadas, fundamenta-se na administração de fármacos citotóxicos. Apesar do objetivo primário tratar-se da destruição das células cancerígenas, a maioria dos fármacos antineoplásicos utilizados atuam de forma não-específica e sistêmica, lesando tanto células cancerígenas quanto normais (DOS SANTOS; DE SOUZA CRUZ, 2001; INCA, 2019). Diante disso, nas últimas décadas, intensas pesquisas relacionadas à sistemas carreadores de fármacos citotóxicos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar a terapia e reduzir os efeitos tóxicos sistêmicos da quimioterapia tradicional. A encapsulação de moléculas terapêuticas têm demonstrado grande potencial na redução de efeitos tóxicos, melhorando a biodistribuição e também facilitando a entrada nas células-alvo (ROSENBLUM et al., 2018).

O álcool perílico (POH) é um monoterpene monocíclico encontrado em óleos essenciais de diversas plantas e frutos cítricos (YERUVA et al., 2007). Diversos estudos verificaram que o POH se mostra eficaz em relação às atividades de inibição da proliferação celular, o que o tornou um bom candidato para estudos de tratamento do câncer (YERUVA et al., 2007). A potente ação do POH se deve à capacidade de inibir a isoprenilação da proteína Ras, atuando desta forma, no controle da proliferação celular. Adicionalmente, também foi demonstrada a sua atuação na ativação das vias pró-apoptóticas, bloqueando o ciclo das células endoteliais e consequente inibição da neovascularização (CHO et al., 2012; CLARK et al., 2002; DA FONSECA et al., 2008; ELEGBEDE, FLORES; WANG, 2003; GELB et al., 1995; LOUTRARI et al., 2004; WISEMAN, WERNER; CROWELL, 2007; XU et al., 2004). Diante do potencial antitumoral, o POH, administrado via oral, foi submetido a uma série de estudos clínicos de fase I e fase II. No entanto, os resultados observados nestes estudos foram

desapontadores, uma vez que a tolerância ao regime posológico via oral foi baixa, contribuindo para a baixa adesão e consequente baixa atividade antitumoral na clínica. Ainda foram observados significativos efeitos adversos como: náuseas, vômitos, diarreia, refluxo gastroesofágico, fadiga, hipocalcemia e pancreatite aguda (CHEN, FONSECA; SCHÖNTHAL, 2015).

Apesar das limitações relacionadas à via de administração oral e também da baixa biodisponibilidade, o POH demonstra potencial para uso como agente tumoral. Diante disso, o nanocarreamento do POH pode resultar em possibilidades interessantes para modular propriedades como perfil toxicológico, biodistribuição e direcionamento seletivo a alvos específicos.

Dentre as numerosas classes de materiais estudadas para fins de encapsulamento de fármacos, sistemas coloidais baseados em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm atraído muita atenção devido à sua natureza, segurança, toxicidade/imunogenicidade reduzida e capacidade de funcionalização (ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010). Dentre eles, os sistemas a base de PLA-*b*-PEG tem se mostrado capaz de suprimir a opsonização, reduzir a agregação e prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea (ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010; GREF et al., 2000). Além disso, esse copolímero se mostra adequado para encapsular e liberar quimioterápicos hidrofóbicos e óleos essenciais, como no caso do POH (BOISSENOT et al., 2016; LEE, CHIU; LO, 2015; MARTINS et al., 2014; MEUNIER, GOUPIL; LIENARD, 2017).

Além das propriedades inerentes ao PLA-*b*-PEG, características adicionais podem ser moduladas funcionalizando-se os grupamentos terminais da cadeia de PEG. Diversos trabalhos têm demonstrado que a presença de moléculas biologicamente ativas na superfície de sistemas nanoparticulados pode influenciar o modo de interação com o ambiente biológico, uma vez que interações ligante-receptor, antígeno-anticorpo e outras formas de reconhecimento molecular estão presentes em células e tecidos (ARRANJA et al., 2017; BYRNE, BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008; NICOLAS et al., 2013). Na terapia do câncer, a vetorização ativa é de particular interesse, pois reduz ou elimina a liberação de substâncias altamente tóxicas em tecidos saudáveis (STEICHEN, CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Dentre os alvos de superfície, os receptores de folato têm se mostrado um dos mais promissores para a vetorização ativa. Os receptores de folato são

altamente expressos em uma variedade de tumores, quando comparado a tecidos normais, podendo ser 100 a 300 vezes maior. Além disso, uma vez que o folato é necessário para a síntese de purinas e pirimidinas, a endocitose associada ao uso do folato permite a internalização e liberação dos sistemas particulados funcionalizados no citoplasma (NICOLAS et al., 2013; STEICHEN, CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Apesar dos diversos aspectos promissores do POH como agente antitumoral, ele apresenta diversos efeitos colaterais frente o uso oral, assim como uma baixa biodisponibilidade. Diante desse contexto, a encapsulação do POH pode representar uma interessante alternativa na eliminação dos efeitos tóxicos. Ao se encapsular o POH e modular a taxa de liberação, torna-se possível diminuir a exposição e o acúmulo de POH em órgãos, como o fígado e rins. O encapsulamento do POH em nanocápsulas apresenta o potencial de melhorar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade *in vivo* associada à administração intravascular, uma vez que nanopartículas têm a capacidade de permanecer por um maior tempo em circulação. Adicionalmente, o recobrimento superficial de nanopartículas com moléculas como o folato também pode representar um significativo aumento na atividade do POH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese de copolímero biodegradável PLA-*b*-PEG conjugado com folato (PLA-*b*-PEG-FOLATO) e posterior obtenção e caracterização de micro e nanocápsulas poliméricas contendo o composto natural álcool perílico, para uma potencial ação vetorizada para tumores que superexpressam receptores de folato.

2.1.1 Objetivos específicos

- Sintetizar os copolímeros dibloco PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato e caracterizar por RMN de ^1H , GPC, DSC, FT-IR e UV-vis;
- Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), indicativo de estabilidade, para a determinação de eficiência de encapsulação do álcool perílico em nanossistemas poliméricos;
- Desenvolver micropartículas e nanopartículas poliméricas de PLA-*b*-PEG contendo álcool perílico pelo processo de emulsificação-evaporação de solvente;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* em meio fisiológico (tampão PBS pH 7,4, 37°C) das micropartículas poliméricas e determinar a cinética de liberação;
- Caracterizar as micropartículas e nanopartículas poliméricas de PLA-*b*-PEG produzidas por diferentes técnicas analíticas, quanto ao tamanho de partícula, morfologia, potencial zeta e teor de fármaco encapsulado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

O câncer se caracteriza por um conjunto de mais de uma centena de diferentes doenças que têm em comum a multiplicação desordenada e incontrolável de células disfuncionais. A rápida e irreversível multiplicação celular pode levar à formação de tumores. Em alguns casos, a agressividade pode ser ainda maior devido à capacidade de se espalhar e invadir tecidos e órgãos distantes (INCA, 2019).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que o câncer é a segunda principal causa de morte a nível global, atrás apenas de doenças cardiovasculares, sendo responsável por aproximadamente uma em cada 6 mortes. Estima-se que em 2018 cerca de 9,6 milhões de pessoas faleceram em virtude de algum tipo de câncer (WHO, 2018). No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019 apontou para aproximadamente 600 mil novos casos, reforçando também a magnitude do problema em nosso país (INCA, 2019). As principais causas de câncer no ano de 2018 foram: pulmão e mama (2,09 milhões cada), colorretal (1,8 milhões), próstata (1,3 milhões), pele do tipo não melanoma (1,04 milhões) e estômago (1,03 milhões) (WHO, 2018). No Brasil, em 2018, o câncer de pele do tipo não melanoma foi o mais incidente na população (85 mil casos), seguido pelos tumores de próstata (68 mil), mama feminina (60 mil), cólon e reto (36 mil), pulmão (31 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (16 mil) (INCA, 2019).

A origem do câncer ocorre através da mutação de células normais em células tumorais através de um processo denominado carcinogênese. As causas da carcinogênese ainda não estão totalmente compreendidas, porém sabe-se que as mutações são resultantes de efeito cumulativo entre fatores genéticos associados à exposição de agentes externos relacionados ao ambiente e hábitos pessoais, incluindo: agentes físicos como a radiação ultravioleta e ionizante; químicos como asbestos, fumo e aflatoxinas; e biológicos como vírus, bactérias e parasitas (WHO, 2018).

O câncer trata-se de um conjunto de doenças relacionadas, que diferem quanto ao tipo de célula acometida, localização física do tumor no organismo,

agressividade e capacidade de sofrer metástase. Adicionalmente, o estágio de desenvolvimento aliado às individualidades dos pacientes tornam o tratamento um grande desafio (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2019; NIH, 2019; URRUTICOECHEA et al., 2010).

A intervenção cirúrgica, quando possível, é o tratamento mais eficiente no caso de tumores sólidos primários. Pois, é possível remover 100% das células cancerígenas. No entanto, abordagens múltiplas associando técnicas distintas, seja por via neoadjuvante ou adjuvante, podem aumentar significativamente as chances de cura e sobrevida dos pacientes. Um exemplo é a radioterapia, que consiste na exposição localizada às radiações ionizantes de alta energia, que podem ser eletromagnéticas (raios X ou gama) e particuladas (partículas α e β , prótons e nêutrons). Tais radiações promovem a redução e/ou eliminação do tecido neoplásico através de danos ao DNA e consequente redução da multiplicação celular (DOS SANTOS; DE SOUZA CRUZ, 2001; INCA, 2019; NIH, 2019).

Outra técnica de tratamento, a fototerapia ou terapia fotodinâmica, que consiste na administração, sistêmica ou localizada, de fármacos fotossensibilizantes seguida de estímulo localizado por luz com comprimento de onda específico para o agente fotossensibilizante. No entanto, a aplicação dessa técnica possui limitações devido à baixa penetração tecidual da radiação utilizada, assim como, a toxicidade tecidual provocada pela bioacumulação dos agentes fotossensibilizantes em órgãos normais (ALMEIDA et al., 2005; DA HORA MACHADO, 2000; NIH, 2019).

A imunoterapia, que se fundamenta no estímulo das próprias defesas do corpo, potencializando o sistema imunológico no combate às células cancerígenas. O estímulo com o interferon α , interleucina-2 e mesmo o BCG (*Bacillus Calmette Guéres*), apesar de promissor no combate ao câncer, trata-se de uma técnica antineoplásica adjuvante e usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (ALMEIDA et al., 2005; NIH, 2019).

A quimioterapia é uma das técnicas mais comumente associada à remoção cirúrgica, consistindo na administração de fármacos com potencial de reduzir ou impedir o crescimento das células, podendo ser utilizado apenas um fármaco ou a combinação de diferentes fármacos (DOS SANTOS; DE SOUZA

CRUZ, 2001; INCA, 2019). No caso específico da quimioterapia, apesar do objetivo primário tratar-se da destruição das células cancerígenas, a maioria dos agentes antineoplásicos utilizados atuam de forma não-específica e sistêmica, lesando tanto células cancerígenas quanto normais. Uma vez que as células tumorais apresentam rápida taxa de multiplicação celular, os efeitos da quimioterapia sobre elas são mais pronunciados, desencadeando a apoptose pelo bloqueio do ciclo celular e/ou danos no DNA. Entretanto, células normais e de rápida renovação, a exemplo das gastrointestinais, capilares, medula óssea e do sistema imune, também são significativamente afetadas. Isso explica parte dos efeitos colaterais do uso da quimioterapia, como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções. Uma vez que o corpo humano recupera-se destes inconvenientes após o término do tratamento, o uso clínico da quimioterapia exige uma ponderação entre benefícios e toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (ALMEIDA et al., 2005; HUANG et al., 2017; INCA, 2019; URRUTICOECHEA et al., 2010; WORKMAN; KAYE, 2002).

Além das terapias supracitadas, outras opções de tratamento podem ser utilizadas. No entanto, a eficácia terapêutica frequentemente torna-se limitada diante da heterogeneidade da doença. Ademais, a natureza da doença é tal que, a menos que todas as células tumorais sejam destruídas, há a possibilidade de reincidência, normalmente associada a tumores mais agressivos e resistentes à terapia (NIH, 2019).

Nas últimas décadas, intensas pesquisas relacionadas à sistemas carreadores de fármacos citotóxicos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar a terapia e reduzir os efeitos tóxicos sistêmicos da quimioterapia tradicional. A encapsulação de moléculas terapêuticas têm demonstrado grande potencial na redução de efeitos tóxicos, melhorando a biodistribuição e também facilitando a entrada nas células-alvo (ROSENBLUM et al., 2018).

3.2 NANOMEDICINA

O uso do termo nano pode gerar discussão, dependendo da área de aplicação. Existe, no entanto, um consenso entre a física, química e biologia, de que a nanotecnologia representa não apenas uma miniaturização, mas sim, o aparecimento de novas propriedades físicas, químicas e/ou biológicas,

dramaticamente diferentes das normalmente observados nos materiais a granel, e que surgem devido à redução de pelo menos uma de suas dimensões abaixo de um tamanho crítico (CHENG et al., 2013; DURAN, MORAIS; MATTOSO, 2006; ZARBIN, 2007). Apesar de ser uma questão em discussão, no campo da medicina, o prefixo nano pode ser atribuído a estruturas supramoleculares sólidas com tamanhos na faixa de 1 – 1000 nm (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016; COUVREUR, 2013; KULKARNI; FENG, 2013; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Graças à escala nano, torna-se possível administrar intravenosamente dispersões de partículas sólidas contendo fármacos, o que seria impossível sem o uso dessa tecnologia devido ao risco de embolia. Além disso, o nanocarreamento de fármacos permite modular propriedades como a biodistribuição, dose e efeito, perfil toxicológico e direcionamento seletivo a alvos específicos (COUVREUR, 2013; SHI et al., 2017).

Diversos nanossistemas estão atualmente aprovados para uso clínico no tratamento de diferentes tipos de câncer. Por exemplo, nos Estados Unidos estão aprovados o Doxil[®], Abraxane[®], Marqibo[®], DaunoXome[®], DepoCyt[®], Oncaspar[®], e Onivyde[®], Coreia do Sul o Genexol-PM[®], Japão o SMANCS[®] e na Europa o Abraxane[®], DaunoXome[®], Myocet[®] e Mepact[®], NanoTherm[®] (SHI et al., 2017; TRAN et al., 2017).

Dentre as numerosas classes de materiais estudadas para fins de encapsulamento de fármacos, sistemas coloidais baseados em polímeros têm atraído muita atenção devido à flexibilidade oferecida pelos métodos de síntese macromolecular e diversidade quase infinita de polímeros, em termos de natureza, propriedades, composição e funcionalização.

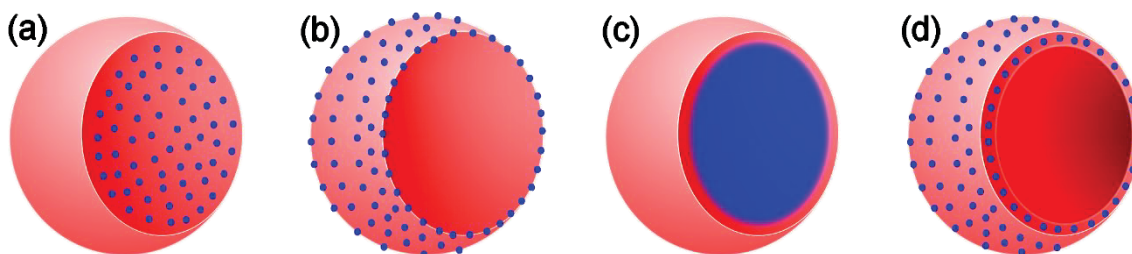
3.2.1 Nanopartículas poliméricas

Inicialmente, o uso de nanossistemas baseava-se em polímeros não biodegradáveis, tais como poli (metil metacrilato), poliacrilamida, poliestireno e poliacrilatos. No entanto, do ponto de vista fisiológico, tais polímeros apresentam limitações em relação à segurança, uma vez que podem se bioacumular nos tecidos ocasionando toxicidade crônica e reações inflamatórias (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016). Por outro lado, o uso de polímeros biodegradáveis tem se tornado muito mais vantajoso, possibilitando novas abordagens de

tratamento, assim como, de diagnóstico. Além da toxicidade reduzida devido à biocompatibilidade, esses polímeros também demonstram capacidade de modular a liberação de fármacos, biodistribuição e bioacumulação (KARLSSON, VAUGHAN; GREEN, 2018). Os principais polímeros biodegradáveis utilizados na área médica são o poli (lactídeo), poli (lactídeo-co-glicolídeo), poli(ω -caprolactona), poli (aminoácidos), além de substâncias de origem natural, como a quitosana, albumina e alginato (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016; KARLSSON, VAUGHAN; GREEN, 2018; ZHANG et al., 2013).

Dependendo do processo farmacotécnico de obtenção, o nano sistema obtido pode se caracterizar como: nanocápsulas, nanoesferas, micelas, lipossomas, dendrímeros, entre outros. Basicamente, eles diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural polimérica (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016; COUVREUR, 2013; HALEY; FRENKEL, 2008). Nanoesferas compreendem sistemas matriciais sólidos constituídos por polímero, na qual o fármaco pode ficar retido internamente e/ou adsorvido à superfície (FIGURA 1a,b). Nanocápsulas compreendem um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo líquido (oleoso ou aquoso), podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (FIGURA 1c,d). Geralmente, nanossistemas poliméricos são esféricos, porém formas anisotrópicas também são descritas na literatura (COUVREUR, 2013; MORA-HUERTAS, FESSI; ELAISSARI, 2010; RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOESFERAS E NANOCAPSULAS

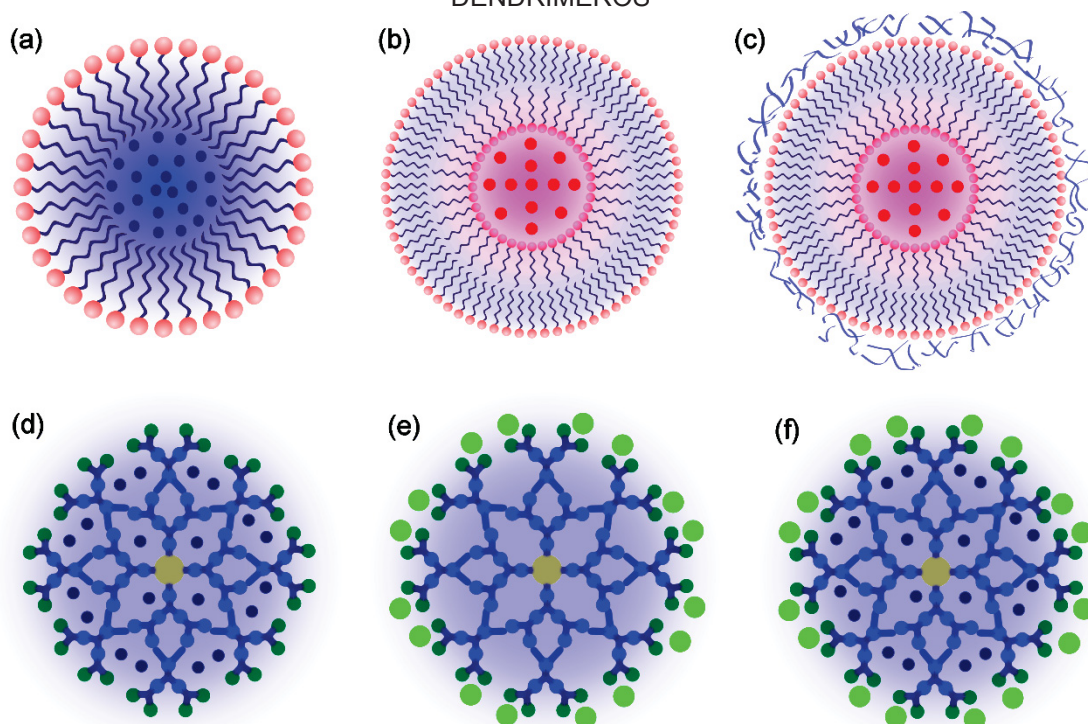


NOTA: (a) fármaco (núcleos azuis) retido internamente na matriz polimérica da nanoesfera; (b) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na superfície da matriz polimérica da nanoesfera; (c) fármaco dissolvido no núcleo da nanocápsula polimérica; (d) fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula.

FONTE: Autor (2019).

Micelas poliméricas são estruturas esféricas ou globulares que se formam quando copolímeros anfifílicos se agregam, geralmente de forma que a porção hidrofóbica forma o núcleo central da esfera em um ambiente líquido. As extremidades hidrofílicas das moléculas entram em contato com o ambiente líquido externo que envolve a estrutura micelar, formando um manto. As micelas são úteis para a entrega de fármacos insolúveis em água (FIGURA 2a) (MOGHIMI, HUNTER; MURRAY, 2005; ZHANG, HUANG; LI, 2014). Lipossomas são estruturas vesiculares compostas de camadas lipídicas e classificadas de acordo com o número de bicamadas lipídicas, podendo ser unilamelares ou multilamelares. Sistemas unilamelares normalmente possuem um núcleo aquoso para encapsulação de fármacos solúveis em água (FIGURA 2b), enquanto sistemas multilamelares podem ser usados para encapsular fármacos lipossolúveis. Adicionalmente, a superfície externa dos lipossomas pode ser revestido com polímeros hidrofílicos inertes, tais como o polietilenoglicol (PEG), contribuindo para o aumento do tempo de circulação (FIGURA 2c) (HALEY; FRENKEL, 2008; ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2016). Dendrímeros são estruturas tridimensionais regularmente ramificadas com uma molécula central multifuncional. As unidades de ramificação podem emergir por polimerização a partir do núcleo central ou podem ser sintetizadas a partir da periferia e terminadas na molécula central. Os comprimentos das ramificações têm limitações estéreis e as formas de dendrímeros são esféricas/globulares com tamanho molecular pequeno, mas com alto peso molecular. As moléculas de fármacos podem estar protegidas nos canais dendríticos no ambiente interior da esfera (FIGURA 2d) ou estar anexadas a grupos funcionais na superfície do dendrímero (FIGURA 2e). Esses nanossistemas podem hospedar uma variedade de moléculas transportadoras, tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas (FIGURA 2f) e são agentes de entrega úteis para genes e outros agentes anticancerígenos (HALEY; FRENKEL, 2008; HUGHES, 2017; MOGHIMI, HUNTER; MURRAY, 2005).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MICELAS, LIPOSSOMAS E DENDRÍMEROS



NOTA: (a) micela polimérica globular (fármaco hidrofóbico (núcleos azuis) no interior da micela); (b) lipossoma polimérico unilamellar (fármaco hidrofílico (núcleos vermelhos) no interior do lipossoma); (c) lipossoma polimérico unilamellar recoberto com cadeias de polietilenoglicol (fármaco hidrofílico (núcleos vermelhos) no interior do lipossoma); (d) dendrímero polimérico (fármaco hidrofóbico (núcleos azuis) protegido nos canais dendríticos); (e) dendrímero polimérico (fármaco hidrofílico (núcleos verde claro) anexado a grupos funcionais na superfície do dendrímero); (f) dendrímero polimérico (fármaco hidrofóbico (núcleos azuis) protegido nos canais dendríticos e fármaco hidrofílico (núcleos verde claro) anexado a grupos funcionais na superfície do dendrímero);

FONTE: Autor, 2019.

Além de fármacos quimioterápicos amplamente empregados na quimioterapia tradicional do câncer, o advento da nanotecnologia também tem possibilitado estudos com outros compostos que apresentam potencial citotóxico relevante em estudos pré-clínicos. Um exemplo trata-se de compostos de origem vegetal, como o caso do limoneno e alguns de seus derivados como o POH.

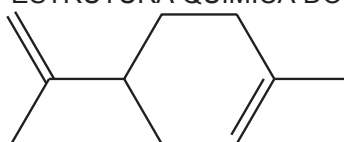
3.3 ALCOOL PERILÍCO

Entre os vários produtos naturais que vêm sendo estudados, destacam-se os compostos da classe dos terpenos, pois apresentam muitas atividades biológicas, em especial as atividades antitumoral (FERNANDES et al., 2005). Os terpenos são frequentemente encontrados em óleos essenciais de plantas,

sendo uma classe com grande variedade estrutural. São formados pela fusão de unidades isoprênicas, as quais são formadas por cinco carbonos (C_5H_8)_n, sendo classificados de acordo com o número dessas unidades (MCGARVEY; CROTEAU, 1995).

Dentre os principais terpenos destaca-se o limoneno (Figura 3), por apresentar atividade quimioterápica contra alguns tipos de câncer, como o de mama e de pâncreas (CERDA et al., 1999; CHEN, FONSECA; SCHÖNTHAL, 2015). Apesar dos resultados promissores para o limoneno, foi observada a necessidade de altas dosagens (1000 a $1200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) para se obter os efeitos antitumorais. Em virtude disso, outros monoterpenos derivados do limoneno começaram a ser investigados, em especial o álcool perílico (POH) (CROWELL et al., 1994).

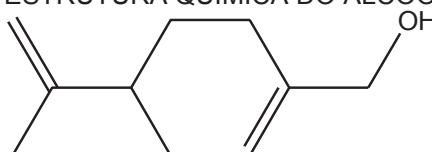
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LIMONENO



FONTE: Autor, 2019.

O álcool perílico (Figura 4) é um monoterpeno monocíclico encontrado em óleos essenciais de diversas plantas e frutos cítricos, incluindo hortelã, cerejas, lavandas, capim-limão, sementes de aipo, gengibre e sálvia, entre outros (YERUVA et al., 2007). Diversos estudos verificaram que o limoneno e o POH se comportam de maneira semelhante em relação a sua metabolização, tanto em ratos como em humanos, sendo metabolizados a ácido perílico (PA). Entretanto, o POH se mostrou mais eficaz em relação às atividades de inibição da proliferação celular, o que o tornou um bom candidato para estudos de tratamento do câncer (CHEN, FONSECA; SCHÖNTHAL, 2015; CROWELL et al., 1994).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁLCOOL PERÍLICO



FONTE: Autor, 2019.

Muitas pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado atividade quimio preventiva do POH frente a diversos tipos de tumores, como de pulmão, cólon, fígado, pâncreas, mama, adenocarcinoma (ELEGBEDE, FLORES; WANG, 2003; WISEMAN, WERNER; CROWELL, 2007; YERUVA et al., 2007), células leucêmicas (CLARK et al., 2002), e gliomas malignos (DA FONSECA et al., 2006). A potente ação do POH se deve à capacidade de inibir a isoprenilação da proteína Ras, atuando desta forma, no controle da proliferação celular. A isoprenilação é importante para a associação das GTPases com a membrana plasmática, tornando estas proteínas capazes de atuarem na via de sinalização requerida para o crescimento e proliferação celular (GELB et al., 1995; HOLSTEIN; HOHL, 2003; NAKADA et al., 2007). Adicionalmente, também foi demonstrada atuação na ativação das vias pró-apoptóticas, bloqueando o ciclo celular de diferentes células tumorais *in vitro* (FERNANDES et al., 2005; XU et al., 2004; YERUVA et al., 2007). Além da atividade citotóxica *per si*, o POH também demonstra atividade apoptótica em células endoteliais e consequente inibição da neovascularização tumoral (A D'ALESSIO et al., 2014; CHO et al., 2012; LOUTRARI et al., 2004).

Diante do potencial antitumoral, o POH, administrado via oral, foi submetido a uma série de estudos clínicos de fase I (7 estudos). Os resultados observados apresentaram razoável toxicidade gastrointestinal, com significativos efeitos adversos como: náuseas, vômitos, diarreia, refluxo gastroesofágico, fadiga, hipocalemia e pancreatite aguda (AZZOLI et al., 2003; BAILEY et al., 2004; HUDES et al., 2000; MORGAN-MEADOWS et al., 2003; MURREN et al., 2002; RIPPLE et al., 2000; RIPPLE et al., 1998). Adicionalmente, 4 ensaios clínicos de fase II foram realizados com o POH, também por via oral. No entanto, os resultados observados foram desapontadores, uma vez que a tolerância ao regime posológico por via oral foi baixa, contribuindo para a baixa adesão e consequente baixa atividade antitumoral na clínica (BAILEY et al., 2008; BAILEY et al., 2002; LIU et al., 2003; MEADOWS et al., 2002).

Adicionalmente, estudos de farmacocinética do POH demonstram que ele é rapidamente metabolizado em ácido perílico (PA) e ácido dihidroperílico (DHPA). A meia vida para os metabólitos são de aproximadamente 1 a 4 horas (AZZOLI et al., 2003; BAILEY et al., 2004; HUDES et al., 2000; RIPPLE et al.,

2000; RIPPLE et al., 1998). Evidencia-se diante disso que, a manutenção da concentração plasmática do POH e seus metabólitos, em níveis adequados para um efeito desejado, exige doses frequentes (CHEN, FONSECA; SCHÖNTHAL, 2015).

O uso do POH como agente antitumoral também tem sido estudado sob outras formas de administração. A inalação nasal em pacientes com glioma maligno cerebral tem se mostrado uma alternativa interessante, uma vez que a mucosa nasal apresenta alta vascularização, fluxo sanguíneo elevado e área superficial. Estudos têm demonstrado eficácia e boa tolerabilidade ao POH quando administrado pela via nasal (DA FONSECA et al., 2008; DA FONSECA et al., 2011; DA FONSECA et al., 2013).

Apesar das limitações relacionadas à via de administração oral e também da baixa biodisponibilidade, o POH tem potencial para uso como agente tumoral, haja vista, sua aplicação por inalação. Diante disso, o nanocarreamento do POH pode representar possibilidades interessantes para modular propriedades como perfil toxicológico, biodistribuição e direcionamento seletivo a alvos específicos.

3.4 DELINEAMENTO DE NANOSSISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS

Pesquisas recentes na área terapêutica e de diagnóstico do câncer têm focado em identificar “nanossistemas ideais” através da investigação das propriedades estruturais/superficiais e suas relações com a interface biológica. No geral, as propriedades dos nanossistemas dependem do tamanho e geometria, características físico-químicas de superfície e material utilizado e entender sobre estes parâmetros contribui no adequado delineamento de nanossistemas terapêuticos. Como exemplo, pode se citar a influência que esses parâmetros desempenham na sinalização e internalização celular (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016; CHENG et al., 2013; REIS et al., 2006).

3.4.1 Influência do microambiente tumoral no delineamento de nanopartículas poliméricas

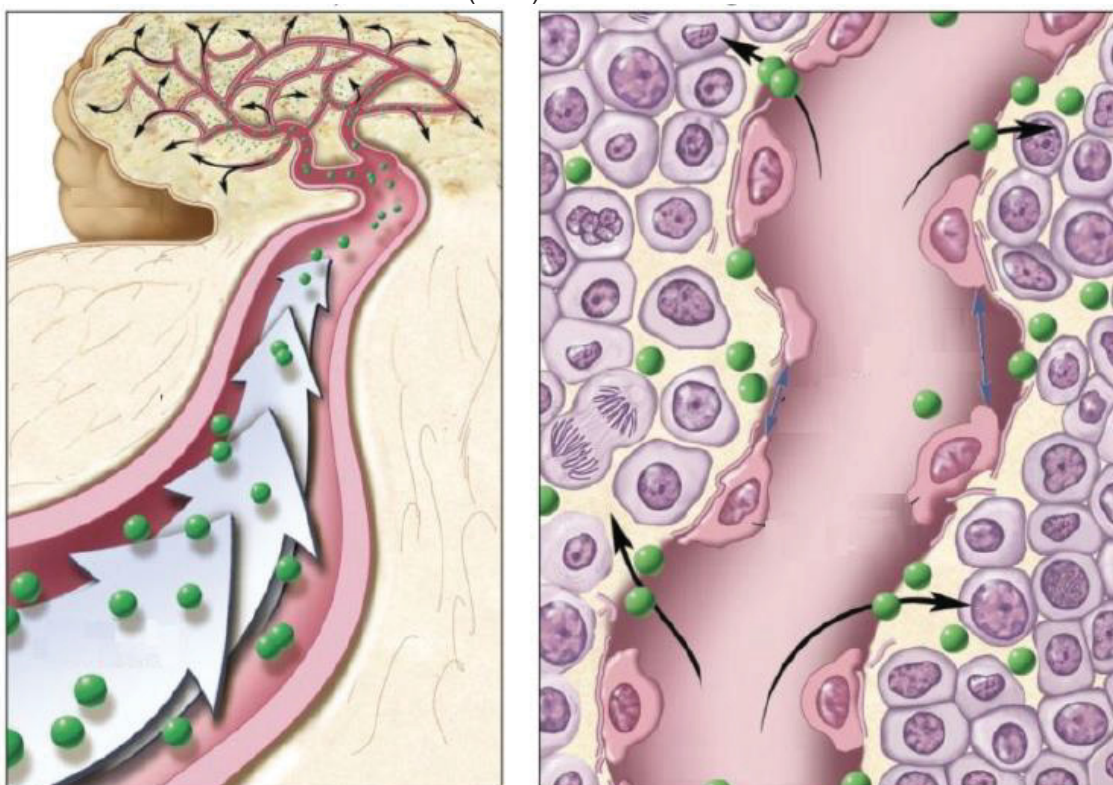
A compreensão sobre parâmetros fisiológicos, como o ambiente tumoral, possibilita um delineamento farmacotécnico mais adequado das características físico-químicas das nanopartículas. Via de regra, tumores sólidos conseguem obter nutrientes por difusão passiva até atingir um tamanho de cerca de 2 mm³ (HALEY; FRENKEL, 2008). Para continuar o crescimento, é necessário que haja angiogênese periférica, a fim de fornecer nutrientes à massa tumoral em expansão. A angiogênese tumoral pode ser iniciada por uma variedade de sinais biológicos. No entanto, o processo não ocorre de forma ordenada. Dessa forma, os tumores têm áreas pouco vascularizadas com necrose resultante (normalmente áreas centrais) e áreas ricamente vascularizadas (áreas mais externas do tumor). Além disso, a angiogênese desordenada faz com que os vasos tumorais sejam anormalmente ramificados, tortuosos e “cegos”. Além disso, os vasos tumorais são fenestrados devido a anormalidades da membrana basal e diminuição do número de pericitos que revestem as células endoteliais (BABAN; SEYMOUR, 1998). Isto resulta em uma permeabilidade aumentada a moléculas pequenas, que difundem facilmente através da parede do vaso para o interstício que envolve as células tumorais. O tamanho das fenestrações entre as células endoteliais tumorais varia de 100 a 780 nm, dependendo do tipo de tumor (FORSTER et al., 2017; HALEY; FRENKEL, 2008; HOBBS et al., 1998). No caso de vascularização normal, as junções endoteliais tipicamente apresentam fenestrações de 5 a 10 nm de tamanho.

Além disso, o interstício tumoral é composto de uma rede de colágeno e um fluido semelhante a um gel, o qual apresenta alta pressão intersticial, oferecendo resistência ao fluxo de moléculas para dentro do tumor. O transporte molecular para o interstício tumoral é determinado pela força de equilíbrio entre a pressão intersticial externa e as propriedades da nanopartícula difusora, incluindo tamanho, forma, natureza hidrofóbica e carga elétrica. Uma vez que as pressões intersticiais tumorais são maiores no centro do tumor e mais baixas na periferia, reduz-se a difusão para o centro dos tumores (JAIN, 2012; KOBAYASHI, WATANABE; CHOYKE, 2014). Nanopartículas mais pequenas (10 – 200 nm em diâmetro) tendem a se difundir mais facilmente e de forma mais

homogênea nessas regiões de maior pressão intersticial (KOBAYASHI, WATANABE; CHOYKE, 2014). Além disso, os tumores não possuem redes linfáticas bem definidas, proporcionando às nanopartículas que ganham acesso intersticial, tempos de retenção prolongados devido à baixa drenagem (HALEY; FRENKEL, 2008).

A alta permeabilidade endotelial e retenção observada na maioria dos tecidos tumorais sólidos, possibilita que nanopartículas circulantes (20 – 200 nm em diâmetro) se concentrem nesses tecidos em detrimento dos tecidos saudáveis. Esta característica é denominada de efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR – do inglês *enhanced permeability and retention*). Dessa forma, nanopartículas na ordem de tamanho de alguns poucos nanômetros se acumulam passivamente nos interstícios tumorais (Figura 5) (DANHIER, 2016; MAEDA, 2001; 2010; 2015; MAEDA, BHARATE; DARUWALLA, 2009; MAEDA et al., 2000).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA (EPR) NO TECIDO TUMORAL



FONTE: Adaptado de Kobayashi (2014).

3.4.2 Outros fatores que contribuem no delineamento de nanopartículas poliméricas

Quando administrado intravenosamente, nanopartículas tendem a circular por longos períodos se elas não forem pequenas o suficiente para serem excretadas pelos rins ou grandes o suficiente para serem reconhecidas pelo sistema retículo endotelial (RES do inglês *reticuloendothelial system*). A filtração glomerular também influencia fortemente no delineamento das características de nanopartículas, uma vez que a taxa de excreção pode influenciar no tempo de circulação sanguínea e consequentemente diminuir o bioacúmulo pelo efeito EPR. A membrana basal glomerular é formada por células especializadas e tecidos conjuntivos com superfície carregada negativamente. O glomérulo tem principalmente poros redondos com cerca de 6 nm de diâmetro (KOBAYASHI; BRECHBIEL, 2005; KOBAYASHI, WATANABE; CHOYKE, 2014), portanto, nanopartículas com tamanho próximo a 6 nm têm excreção renal aumentada. Além disso, moléculas carregadas positivamente ou neutras são filtradas mais eficientemente que as carregadas negativamente (KOBAYASHI et al., 1999). A forma (CANELAS, HERLIHY; DESIMONE, 2009) e flexibilidade (dureza ou maciez) (OGAWA et al., 2010) das nanopartículas também influenciam a eliminação por filtração.

Além da eliminação por filtração glomerular, o fígado e o RES também removem corpos estranhos presentes na corrente sanguínea. Todas as nanopartículas, quando na corrente sanguínea, são substâncias estranhas ao organismo, portanto, também devem ser projetadas para serem furtivas ao fígado e/ou RES, possibilitando maiores tempos de circulação. Nanopartículas hidrofóbicas são frequentemente associados a proteínas séricas, sendo reconhecidas e metabolizadas pelo fígado (MUELLER et al., 1992). Moléculas ou partículas maiores também são prontamente reconhecidas pelo RES, assim como moléculas ou partículas com superfícies altamente carregadas. Por conseguinte, os parâmetros de desenvolvimento de sistemas nano particulados incluem a limitação de tamanho (preferencialmente < 300 nm de diâmetro) e a manutenção de uma carga líquida superficial próxima do neutro (RES) ou negativo (filtração glomerular). Assim como, proporcionar simultaneamente uma superfície hidrofílica (MAEDA, NAKAMURA; FANG, 2013). Para alcançar estas

características, polímeros hidrofílicos e neutros, incluindo polietilenoglicol e polissacarídeos, são comumente usados na superfície de sistemas nanométricos para torná-los furtivos, diminuindo o reconhecimento pelo fígado e RES (HAMIDI, AZADI; RAFIEI, 2006).

Dentre as várias características que influenciam no efeito EPR, a mais importante é possuir um tamanho maior que cerca de 10 nm, a fim de evitar a filtração glomerular (MAEDA, NAKAMURA; FANG, 2013). No entanto, este requerimento sozinho não é suficiente para que o efeito EPR tenha significância e outros parâmetros devem ser considerados (QUADRO 1).

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS EM NANOPARTÍCULAS PARA QUE OCORRA O EFEITO EPR

Biocompatibilidade	Mínima interação com componentes do sangue, vasos sanguíneos, antigenicidade, <i>clearance</i> pelo sistema reticulo endotelial e lise celular.
Tamanho molecular	Tamanho maior que o limite necessário para o <i>clearance</i> pelo sistema renal (> 10 nm).
Carga de superfície	Carga líquida fracamente negativa a neutra.
Tempo de circulação	Preferencialmente maior do que algumas horas para que haja retenção.

FONTE: Adaptado de Maeda (2013).

Em relação à influência da carga de superfície, além do já exposto anteriormente, também deve-se considerar que a superfície luminal dos vasos possui superfície carregada negativamente. Isso significa que nanopartículas poliméricas com cargas positivas se ligam não especificamente à superfície luminal das paredes vasculares e são rapidamente eliminados da circulação sanguínea. Partículas com altas cargas negativas, no entanto, são mais facilmente eliminadas pela metabolização no fígado (MAEDA, NAKAMURA; FANG, 2013). Outro aspecto importante sobre a hidrofobicidade de nanopartículas, é que uma maior hidrofobicidade resulta em uma maior afinidade pela membrana celular e uma captação endocítica muito mais rápida (ODA; MAEDA, 1987; ODA, MORINAGA; MAEDA, 1986).

Em se tratando de desenvolvimento de sistemas nanoparticulados de entrega de fármacos e/ou diagnóstico, ainda existem as possibilidades de vetorização passiva e ativa. De forma geral, a vetorização fundamenta-se em

proporcionar o direcionamento e acúmulo das nanopartículas em tecidos específicos, por exemplo tecidos tumorais sólidos. No caso da vetorização passiva é importante que o nanossistema seja projetado de forma a possibilitar o maior bioacúmulo possível em função do efeito EPR, assim como permitir um tempo de circulação prolongado. Dentre uma das alternativas para se aumentar a furtividade de nanopartículas, a presença de polietilenoglicol (PEG) na superfície é, até o momento, a estratégia mais utilizada. O PEG apresenta características físico-químicas como alta hidrofiliabilidade, cadeias flexíveis, neutralidade elétrica e a ausência de grupos funcionais. O recobrimento de nanopartículas com PEG proporciona um maior tempo de circulação devido à capacidade do PEG em impedir estericamente a opsonização das nanopartículas (ALEXIS et al., 2008; ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010). Além do comportamento de longa circulação na corrente sanguínea, tem-se sugerido que esse revestimento pode afetar sua interação com superfícies biológicas, tais como a mucosa nasal e intestinal e, conseqüentemente, aumentar sua capacidade de funcionar como transportadores de fármacos através das membranas (TOBIO et al., 1998; TOBIO et al., 2000). Duas técnicas principais podem ser utilizadas para alterar a superfície das nanopartículas: adsorção de PEG na superfície das nanopartículas ou a conjugação química do PEG com o polímero formando-se blocos copolímeros ligados covalentemente. Apesar de mais simples, a adsorção do PEG na superfície das nanopartículas apresenta desvantagens como a rápida remoção das cadeias de PEG quando na corrente sanguínea. Por outro lado, a ligação covalente favorece uma maior densidade de PEG na superfície das nanopartículas, proporcionando uma conformação similar às cerdas de uma escova, o que aumenta consideravelmente o tempo de circulação sanguínea (GREF et al., 2000; JOKERST et al., 2011; VAN VLERKEN, VYAS; AMIJI, 2007).

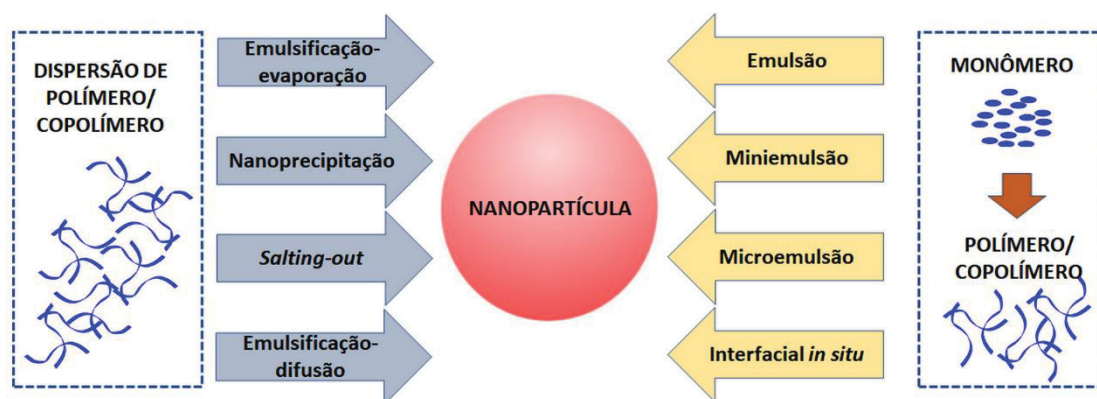
A vetorização ativa, por sua vez, é caracterizada pela conjugação de ligantes específicos na superfície das nanopartículas, os quais são reconhecidos especificamente por receptores, normalmente super expressos pelas células do tecido alvo (NICOLAS et al., 2013). A vetorização ativa baseia-se no conceito de interações intermoleculares ligante-receptor, antígeno-anticorpo ou outras formas de reconhecimento presente em células e tecidos (ARRANJA et al., 2017; BYRNE, BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008; NICOLAS et al., 2013).

Um exemplo de vetorização ativa é a ligação de folato às nanopartículas buscando-se a interação com receptores de folato expressos na superfície celular. Sabe-se que células de muitos tipos de câncer super expressam receptores de folato em sua superfície, além de apresentarem uma maior afinidade de ligação pelo folato conjugado em nanopartículas do que pelo o folato livre (KUKOWSKA-LATALLO et al., 2005; SUDIMACK; LEE, 2000; SUDIMACK MOSELEY, 2002). Após reconhecimento, a nanopartícula conjugada com folato sofre endocitose mediada pelo receptor que se localiza no citoplasma da célula. Em seguida, o fármaco pode ser liberado pela nanopartícula para iniciar a ação citotóxica na célula alvo. Este conceito de direcionamento pode ser expandido para qualquer antígeno específico do tumor e seu ligante.

3.5 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Várias estratégias podem ser empregadas para produzir nanopartículas carreadores de fármacos e/ou sistemas nanoparticulados voltados ao diagnóstico. A escolha do método de preparação depende principalmente dos materiais poliméricos a serem utilizados, do fármaco a ser encapsulado e área de aplicação. Além disso, as características físico-químicas desejadas para as nanopartículas podem ser determinadas pela escolha da técnica de obtenção a ser empregada (NICOLAS et al., 2013; RAO; GECKELER, 2011). De forma geral, essas técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em técnicas de montagem partindo-se de (co)polímeros pré-formados ou técnicas de montagem a partir da polimerização de monômeros (Figura 6) (RAO; GECKELER, 2011). O processo de obtenção também pode ser classificado entre métodos que envolvem alta energia para emulsificação (energia mecânica necessária para formar grandes áreas interfaciais) ou baixa energia de emulsificação (formação espontânea devido às propriedades físico-químicas intrínsecas dos componentes) (ANTON, BENOIT; SAULNIER, 2008). Dentre os vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos, destacam-se: (I) polimerização interfacial *in situ*, (II) nanoprecipitação e (III) emulsificação-evaporação de solvente (BANIK, FATTAHI; BROWN, 2016; MORA-HUERTAS, FESSI; ELAISSARI, 2010; NICOLAS et al., 2013).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TÉCNICAS MAIS UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS



FONTE: Adaptado de Banik (2016).

A polimerização interfacial *in situ* é um método muito utilizado por ser simples e reprodutível para a obtenção de nanopartículas a partir da polimerização de monômeros. A técnica baseia-se na solubilização dos monômeros e fármaco em um solvente ou mistura de solventes e posterior gotejamento em uma solução aquosa ácida que contenha um tensoativo não-iônico ou um estabilizador, sob intensa agitação (COUVREUR et al., 2002; REIS et al., 2006). A polimerização ocorre rapidamente na interface da gota, iniciada pelos íons presentes na fase aquosa. As nanopartículas são formadas espontaneamente, resultando em uma suspensão coloidal. Após polimerização e formação das partículas, as suspensões são submetidas à evaporação para a remoção do solvente orgânico (REIS et al., 2006). Essa técnica possui desvantagens por apresentar resíduos de monômeros e oligômeros na formulação, que por sua vez apresentam toxicidade e podem reagir com o fármaco, fato que pode dificultar o controle da massa molecular do polímero resultante, e inviabilizar a liberação da substância ativa (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Ao contrário da polimerização a partir de monômeros, a automontagem a partir de copolímeros pré-formados possibilita o preparo de sistemas nanoparticulados com várias morfologias. Os copolímeros utilizados devem ser constituídos por blocos de diferentes características físico-químicas e a automontagem em solução é conduzida pela diferente afinidade, também referida como seletividade em bloco, do solvente para cada bloco do copolímero. O tamanho específico e a morfologia de tais estruturas automontadas são

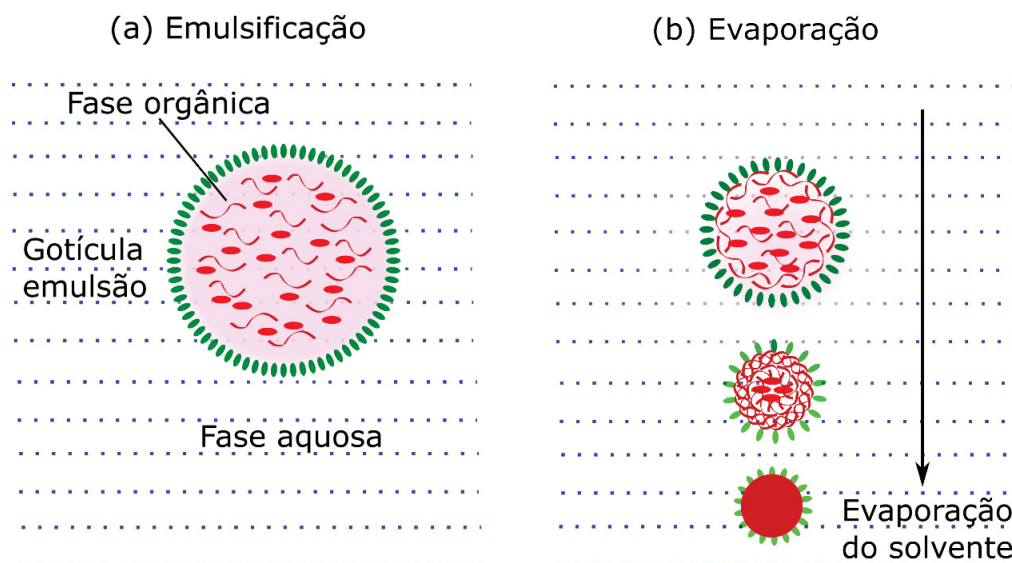
impulsionados em grande parte por forças termodinâmicas (LODGE, PUDIL; HANLEY, 2002). Entre os diferentes métodos que foram propostos até agora, dois deles são amplamente utilizados: (I) a técnica de nanoprecipitação, e (II) o processo de emulsificação-evaporação de solvente. Geralmente, nessas técnicas, a solução orgânica constitui a fase interna das nanopartículas, na qual o fármaco é dissolvido, e a fase externa ou contínua é constituída de água e agentes estabilizantes. Outra similaridade entre essas técnicas é a baixa capacidade de encapsular fármacos hidrossolúveis, sendo preferencialmente utilizadas para fármacos lipossolúveis (NICOLAS et al., 2013; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; RAO; GECKELER, 2011).

O método de nanoprecipitação baseia-se nas propriedades inerentes de solubilidade e gelificação dos polímeros em diferentes solventes. Basicamente, essa técnica requer dois solventes que são miscíveis e que, tanto o polímero como o fármaco sejam solúveis em apenas em um deles (o solvente), mas não no segundo (o não solvente). A nanoprecipitação ocorre naturalmente pela rápida dessolvatação do polímero quando a solução contendo o polímero e fármaco entra em contato com o não solvente. Conforme o solvente contendo o polímero é difundido no meio de dispersão não solvente, o polímero precipita, ocorrendo a encapsulação do fármaco. Em seguida, o solvente orgânico é removido por evaporação à pressão reduzida ou evaporação por agitação da solução (se o solvente for relativamente volátil). A formação instantânea de nanopartículas é governada pelo princípio de Marangoni, que descreve as interações interfaciais entre as fases líquidas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Este método forma nanoesferas, e com adição de um óleo na fase orgânica, é possível a produção de nanocápsulas. A formação das nanocápsulas baseia-se no fato de que quando a fase orgânica, contendo o polímero e o óleo, é vertida na fase não solvente, as vesículas são formadas por emulsificação espontânea, enquanto o solvente se difunde (BILATI, ALLÉMANN; DOELKER, 2005; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; RAO; GECKELER, 2011). A utilização de tensoativos promove a estabilização das gotículas de solvente de tamanho nanométrico até que a completa difusão do solvente e a agregação do polímero ocorra com o aumento da polaridade do meio (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

A técnica de emulsificação-evaporação de solvente e suas variáveis é um dos métodos mais amplamente utilizado para preparar nanopartículas a partir de copolímeros pré-formados, contendo fármacos lipofílicos (RAO; GECKELER, 2011). Nessa técnica, a encapsulação de fármacos lipofílicos é feita pelo preparo de uma emulsão do tipo simples (O/A), em que primeiramente o copolímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível em água, como diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila. A fase aquosa, geralmente contém surfactantes em quantidades apropriadas, tal como colato de sódio (SC) ou álcool polivinílico (PVAI). Inicialmente as fases são previamente emulsionadas sob agitação mecânica (por exemplo, vortezização) e posteriormente expostas à alta tensão de cisalhamento (por exemplo, probes de ultrassom, microfluidificador, ultra homogeneizador etc.). Dessa forma, obtém-se gotículas em escala nanométrica de solvente orgânico contendo copolímeros e fármaco. O solvente orgânico é subsequentemente removido sob agitação magnética (se muito volátil) ou pressão reduzida, induzindo a precipitação e arranjo dos copolímeros em nanopartículas (Figura 7a,b) (KAMALY et al., 2016; NICOLAS et al., 2013). Posteriormente, as nanopartículas solidificadas podem ser coletadas por ultracentrifugação e lavadas com água destilada para remover resíduos de surfactantes (RAO; GECKELER, 2011).

No que diz respeito ao método de emulsificação-evaporação de solvente, parâmetros como a natureza e volume da fase orgânica e aquosa, características dos polímeros e surfactantes, proporção dos constituintes poliméricos na fase orgânica e concentração dos surfactantes na fase aquosa têm implicações relevantes na formação, tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas. Além disso, o tipo e intensidade de energia utilizada nas etapas de emulsificação são fatores determinantes em relação ao tamanho e polidispersão das nanopartículas (NASIR, KAUSAR; YOUNUS, 2015). A emulsificação mecânica possibilita a formação de gotículas com tamanhos na ordem de 1 – 5 μm . Por outro lado, o aporte de alta energia de cisalhamento possibilita a obtenção de partículas submicrométricas com baixa polidispersão de tamanho. Como cada gota possibilita a formação de uma partícula polimérica após a evaporação do solvente, a relação entre o tamanho das nanopartículas com a forma de emulsificação é determinante no resultado (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE



NOTA: (a) representação do processo de emulsificação (gotícula de emulsão contendo fármaco hidrofóbico (núcleos vermelhos) e polímero (vermiforme vinho), estabilizada por surfactantes (núcleos verdes); (b) representação do processo de evaporação do solvente e precipitação dos copolímeros.

FONTE: Autor (2019).

A emulsificação-evaporação de solvente também permite encapsular fármacos hidrofílicos. No entanto, uma emulsão dupla (A/O/A) deve ser formada com o fármaco dissolvido na fase aquosa interna (KAMALY et al., 2016; SAWALHA, SCHROEN; BOOM, 2011). Nessa técnica, a formação da emulsão é o passo mais importante na preparação de nanopartículas, pois o tamanho das gotas da emulsão está diretamente relacionado ao tamanho final das nanopartículas (MANCHANDA et al., 2010).

A técnica de emulsificação-evaporação de solvente tem sido amplamente utilizada para preparar nanopartículas poliméricas a partir de poli(lactídeo) (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), ω -caprolactona (PCL), utilizando vários surfactantes como agentes estabilizantes. No QUADRO 2 são apresentados alguns exemplos de nanopartículas poliméricas obtidas a partir do processo de emulsificação-evaporação de solvente, utilizando o copolímero PLA-*b*-PEG.

QUADRO 2 - EXEMPLOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE, UTILIZANDO O COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG

Copolímero	Substância encapsulada	Vetor	Tipo nanopartícula	Surfactante	Solvente orgânico	Tamanho (nm)	Método	Referência
PLA- <i>b</i> -PEG	Curcumina	-	Micela	-	Etanol	60 – 69	Emulsificação-evaporação de solvente	(PHAN et al., 2016)
PLA- <i>b</i> -PEG-Folato		Folato	Micela	-		80 - 86		
PLA- <i>b</i> -PEG	siRNA	-	Nanopartículas ^(a)	BHEM-Chol ^(b)	Cloroformio	125	Dupla emulsificação-evaporação de solvente	(DIAO et al., 2015)
PLA- <i>b</i> -PEG	Rodamina (fluoróforo)	-	Nanopartículas ^(a)	Álcool poli vinílico	Diclorometano	160 - 230	Emulsificação-evaporação de solvente	(ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010)
PLA- <i>b</i> -PEG-Lactoferrina	Cumarina (fluoróforo)	Lactoferrina	Nanopartículas ^(a)	Colato de sódio	Diclorometano	< 150	Dupla emulsificação-evaporação de solvente	(HU et al., 2009)
PLA- <i>b</i> -PEG	Zidovudina	-	Nanopartículas ^(a)	Álcool poli vinílico	Diclorometano	328 - 374	Dupla emulsificação-evaporação de solvente	(MAINARD ES et al., 2009)

NOTA: (a) Não especificado pelo autor se nanoesfera sólida ou nanocápsulas; (b) Brometo de (*N,N*-bis(2-hidroxietil)-*N*-metil-*N*-(2-colesteriloxi)carbonil aminoetil) amônio.

Em muitos casos, solventes clorados como o diclorometano e clorofórmio são utilizados devido à imiscibilidade em água, facilidade de emulsificação e evaporação devido ao baixo ponto de ebulição. No entanto, esses solventes apresentam certas desvantagens devido à toxicidade (Classe II – *Impurities: Guidelines for Residual Solvents Q3C(R6)*). Solventes como o diclorometano e clorofórmio devem ser limitados em produtos farmacêuticos, no caso do diclorometano o limite de exposição diário deve ser de até 6,0 mg dia⁻¹ ou 600 ppm. Já para o clorofórmio, o limite de exposição diário deve ser de até 0,6 mg dia⁻¹ ou 60 ppm. Portanto, produtos farmacêuticos devem se adequar aos valores residuais desses solventes, conforme a dose diária máxima permitida.

Além do solvente, o tipo e concentração de surfactante também influenciam na forma, tamanho e polidispersão das nanopartículas formadas. Via de regra, uma maior diminuição na tensão interfacial favorece a formação de emulsões mais estáveis devido a estabilização das gotículas, evitando a coalescência e favorecendo uma menor polidispersão (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). PVAI e SC têm sido utilizados como agentes estabilizadores. PVAI tem se mostrado um excelente agente estabilizante para o preparo de nanopartículas poliméricas, principalmente por minimizar a agregação durante as etapas pós preparo (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). O colato de sódio, apesar de influenciar pouco no tamanho e IP, tem se mostrado interessante principalmente por controlar melhor a morfologia das nanopartículas (DIOU et al., 2012).

3.6 POLÍMEROS UTILIZADOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Os materiais utilizados na obtenção de nanoformulações são selecionados de acordo com suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento (DIMER et al., 2013). Polímeros naturais e sintéticos podem ser utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas (KAMALY et al., 2016). Dentre os polímeros naturais, gelatina, albumina e quitosana podem ser empregados. No entanto, o emprego de polímeros naturais é reduzido em relação aos polímeros sintéticos devido a limitação de manipulação de suas propriedades físico-químicas e difícil reprodutibilidade lote

a lote. Por outro lado, a vantagem dos polímeros sintéticos está relacionada à versatilidade quanto a manipulação de sua organização monomérica, o que resulta em propriedades como degradabilidade e compatibilidade em meio biológico, além de apresentarem elevada pureza em comparação aos polímeros naturais (MORA-HUERTAS, FESSI; ELAISSARI, 2010). São alguns exemplos de polímeros sintéticos: poli(lactídeo) (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), ω -caprolactona (PCL) e poli(α -hidroxibutirato) (PHB), poli(acrilato) e poli(metacrilato) (KAMALY et al., 2016). Dentre esses, o PLGA e o PLA têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas devido à excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010).

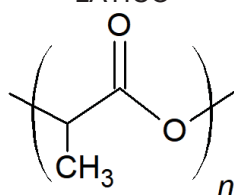
O PLA é um polímero formado por monômeros de ácido láctico. Os dímeros cíclicos deste ácido são ligados por ligações do tipo éster, resultando em um poliéster alifático, hidrolisável, relativamente hidrofóbico e degradável a produtos atóxicos (ácido láctico), os quais estão presentes no metabolismo de carboidratos de animais e microrganismos (KUMARI, YADAV; YADAV, 2010). Uma vez que o organismo metaboliza efetivamente o ácido láctico, há mínima toxicidade sistêmica associada à utilização do PLA, como matriz polimérica para liberação de fármacos ou na sua aplicação como biomaterial (KUMARI, YADAV; YADAV, 2010). O PLA quando comparado ao PLGA, é menos suscetível à reação de hidrólise, já que em sua cadeia polimérica não existe o mero proveniente do ácido glicólico, que possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de H₂O (BENDIX, 1998). Parâmetros como cristalinidade, temperatura de transição vítrea (*T_g*), solubilidade e massa molecular podem influenciar no comportamento de liberação das moléculas do fármaco encapsuladas com esses polímeros. A resistência mecânica, o comportamento de intumescimento, a capacidade de sofrer hidrólise e, posteriormente a taxa de biodegradação são diretamente influenciados pela cristalinidade (KAMALY et al., 2016).

3.6.1 Síntese de copolímeros PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-FOLATO

Poli(ácido láctico) (PLA do inglês *poly(lactic acid)*) (Figura 8) é um poliéster alifático, hidrolisável, relativamente hidrofóbico e degradável a produtos atóxicos

(ácido láctico, CO_2 e H_2O) (KUMARI, YADAV; YADAV, 2010). Tem sido amplamente estudado para aplicações biomédicas devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade em sistemas biológicos. Dentre as principais aplicações na área da medicina, o PLA tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos devido à elevada capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI(ÁCIDO LÁCTICO), ONDE n REPRESENTA O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS DO MONÔMERO LÁCTICO



FONTE: Adaptado de Cabare (2004).

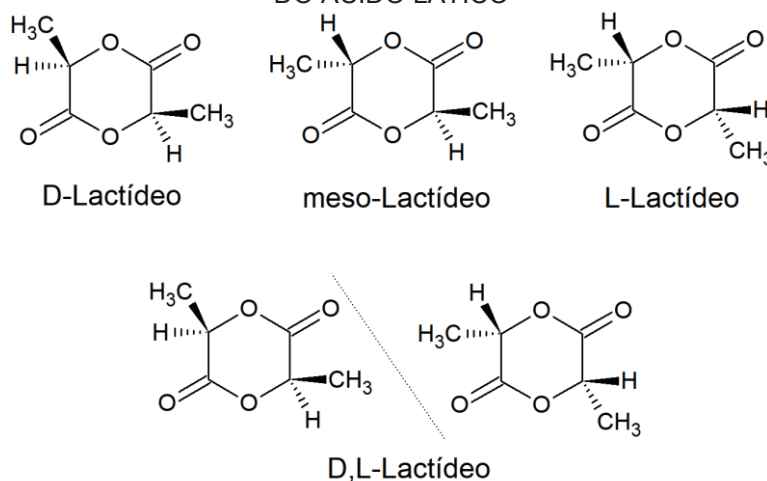
Atualmente uma ampla gama de polímeros são disponibilizados comercialmente, inclusive o PLA e outros copolímeros derivados do poli(ácido láctico). No entanto, o alto valor agregado torna-se um agravante ao seu uso em pesquisas sendo a obtenção sintética uma alternativa mais viável.

Duas são as principais formas de obtenção do PLA. A síntese a partir da poli condensação do monômero ácido láctico ou pela polimerização por abertura do anel do dímero cíclico lactídeo (composto por duas unidades de ácido láctico) (PROIKAKIS, TARANTILI; ANDREOPOULOS, 2002). Enquanto o processo por policondensação necessita de condições severas para se obter polímeros de alta massa molecular (temperaturas de $180 - 200^\circ\text{C}$, pressões abaixo de 5 mmHg e longos períodos reacionais), o processo por abertura do anel permite a obtenção de PLA de alta massa molecular com baixa dispersividade de tamanho, mesmo sob condições reacionais moderadas (HYON, JAMSHIDI; IKADA, 1997; KOWALSKI, DUDA; PENCZEK, 2000). Consequentemente, o método mais comum para se obter PLA de alta massa molar é através da polimerização por abertura de anel a partir do dímero cíclico do ácido láctico (ROP – do inglês *ring-opening polymerization*). Além disso, quando comparando com a policondensação, a ROP tem como vantagem a possibilidade de se produzir polímeros com uma ampla faixa de peso molecular através do controle da pureza

do lactídeo e das condições reacionais (HU et al., 2016; JACOBSEN et al., 1999; KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS; BOETTCHER, 1995; KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS; STRICKER, 2000).

Via de regra, o nome do polímero é baseado na sua origem. Dessa forma, quando se parte de um monômero de ácido láctico o polímero é denominado de poli(ácido láctico). Quando o composto de partida for o lactídeo, o polímero obtido pode também ser chamado de poli(lactídeo). Embora o termo poli(ácido láctico) seja uma denominação generalizada, o polímero formado também pode ser denominado de acordo com o isomerismo correspondente ao dímero cíclico utilizado na polimerização. Dessa forma, poli(*D*-lactídeo) (PDLA) é formado a partir do dímero cíclico *D*-lactídeo; poli(*L*-lactídeo) (PLLA) a partir do dímero cíclico *L*-lactídeo; poli(*D,L*-lactídeo) (PDLLA) a partir do meso-lactídeo. Além disso, há a possibilidade de se obter polímero a partir de uma mistura racêmica entre *L* e *D*-lactídeo, também denominado como poli(*D,L*-lactídeo) (PDLLA) (Figura 9). A polimerização a partir das formas opticamente puras de *L* ou *D*-lactídeo resultam em homopolímeros isotáticos PLLA ou PDLA, respectivamente. Ambos PLLA e PDLA são cristalinos e opticamente ativos. Em contrapartida, a polimerização a partir do lactídeo na forma meso ou racêmica resultam em polímeros opticamente inativos, amorfos e com sequência atática de unidades monoméricas *D* e *L* (BOUAPAO et al., 2009; DECHY-CABARET, MARTIN-VACA; BOURISSOU, 2004; KRICHELDORF, 2001; MASUTANI; KIMURA, 2015; ZHANG et al., 1994).

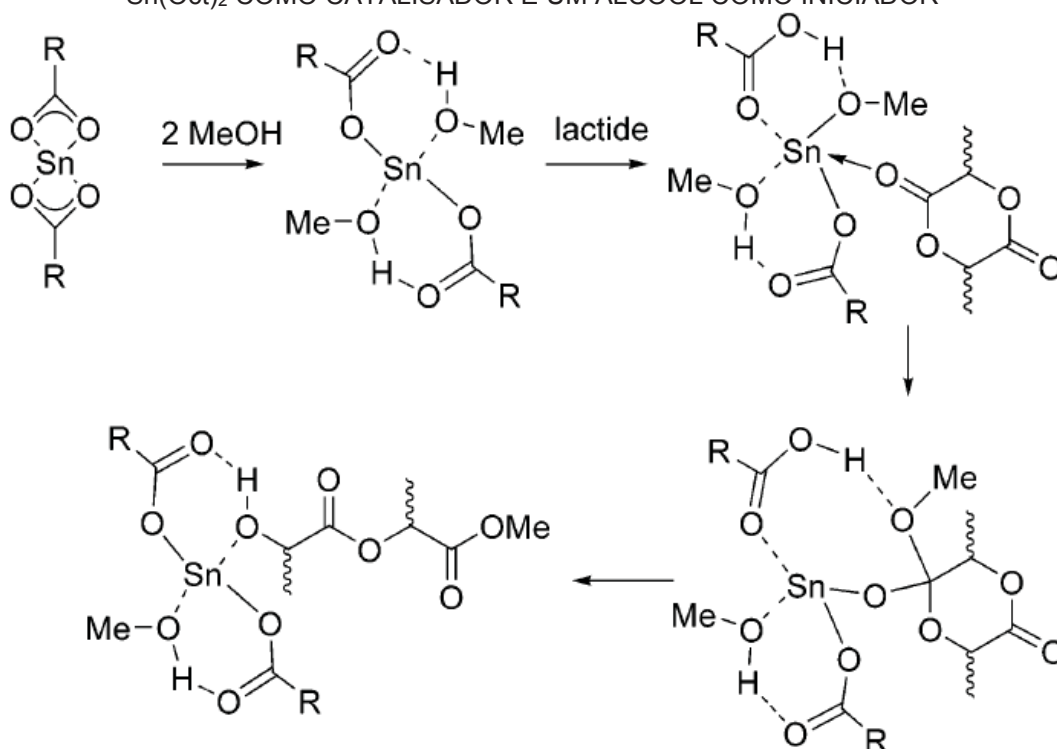
FIGURA 9 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEREOISÔMEROS DO DÍMERO CÍCLICO DO ÁCIDO LÁCTICO



FONTE: Adaptado de Cabare (2004).

Na ROP, são possíveis três formas de indução e propagação da polimerização, a depender do tipo de iniciador e/ou catalizador empregado. São elas: polimerização aniônica, polimerização catiônica e polimerização por inserção por coordenação (KRICHELDORF, 2001; LÖFGREN et al., 1995). Dentre elas a ROP por inserção por coordenação é a mais amplamente utilizada. Basicamente, na presença de alcóxidos metálicos que se caracterizam como ácidos fracos de Lewis, o lactídeo desempenha temporariamente o papel de ligante coordenando com o átomo do metal, via o átomo de oxigênio carbonílico exocíclico. Durante a coordenação, a eletrofilicidade do grupo CO está aumentada, assim como a nucleofilicidade dos grupos OR, ocorrendo a abertura do anel e inserção da lactona na ligação O-metálica. As propagações seguintes ocorrem por um mecanismo semelhante, adicionando-se moléculas de lactídeo a cada etapa (Figura 10) (KALIA; RAINES, 2010; KRICHELDORF, BERL; SCHARNAGL, 1988; OUHADI, STEVENS; TEYSSIÉ, 1975).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE POLIMERIZAÇÃO POR INSERÇÃO POR COORDENAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL DO LACTÍDEO, NA PRESENÇA DE $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ COMO CATALISADOR E UM ÁLCOOL COMO INICIADOR



FONTE: Cabare (2004).

Na ROP, o iniciador mais amplamente utilizado para a produção de PLA é o 2-etil-hexanoato de estanho II ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) (Figura 10). No entanto, o mecanismo de polimerização utilizando esse composto tem sido alvo de muitas controvérsias, pois no estado puro este composto não contém um grupo alcóxido reativo (DECHY-CABARET, MARTIN-VACA; BOURISSOU, 2004; MASUTANI; KIMURA, 2015; ZHANG et al., 1994). A adição de um composto contendo hidroxila como coiniciador permite que pelo menos um grupo octanoato do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ entre em um equilíbrio rápido com o grupamento hidroxila, resultando em uma alcóxido mais reativo $[(\text{ROH})\text{Sn}(\text{Oct})_2]$, o qual atua como o verdadeiro iniciador do processo de polimerização. Como o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ não é convertido quimicamente em nenhuma outra espécie durante a polimerização, assume-se que ele desempenha um papel de catalisador na reação (DU et al., 1995; KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS; BOETTCHER, 1995; KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS; STRICKER, 2000; NIJENHUIS, GRIJPMA; PENNING, 1992; ZHANG et al., 1994).

A polimerização por inserção por coordenação, utilizando o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, é considerada de particular importância por diversos motivos: (1) permite a união do bloco PLA a estruturas pré-formadas como, por exemplo, polietilenoglicol, sorbitol, manitol, entre outros compostos hidroxilados, formando-se copolímeros com diferentes estruturas; (2) apresenta alta eficiência: quase total conversão do monômero é alcançada até mesmo quando a razão monômero/iniciador é alta (10.000:1); (3) o catalisador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ é aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) para fins alimentícios e médicos em muitos países. Além disso, apresenta solubilidade em solventes orgânicos facilitando a reação (DONG et al., 2001; KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS; BOETTCHER, 1995; RYNER et al., 2001).

Embora diversas características, por exemplo a biodegradabilidade, tornem o PLA atrativo como um sistema carreador de fármacos, quando na corrente sanguínea, sua hidrofobicidade facilita a adsorção de proteínas plasmáticas. Tal característica imposta à superfície de sistemas particulados a base de PLA acarreta um considerável aumento do *Clearance* pelo sistema retículo endotelial (RES). Dessa forma, sua aplicação terapêutica torna-se limitada. Uma estratégia que tem sido amplamente utilizada para contornar tal situação é a modificação química do PLA com polietilenoglicol (PEG), obtendo-

se um copolímero dibloco anfifílico (PLA-*b*-PEG). Copolímeros de PLA-*b*-PEG com blocos que apresentam significativas diferenças de solubilidade entre a porção hidrofílica e hidrofóbica são capazes de se auto organizar em estruturas particuladas, apresentando internamente um ambiente hidrofóbico e hidrofiliicidade na camada externa ou superficial. Em sistemas nanoparticulados, a presença da superfície hidrofílica conferida pelo PEG reduz consideravelmente a adsorção de proteínas plasmáticas, limitando assim o *Clearance* pelo RES (ESSA, RABANEL; HILDGEN, 2010; GREF et al., 2000). Além de reduzir a opsonização, a redução na hidrofobicidade superficial também proporciona vantagens interessantes como um aumento na solubilidade em água, redução da agregação e prolongamento da liberação do fármaco *in vivo* (JOKERST et al., 2011; VAN VLERKEN, VYAS; AMIJI, 2007). Dentre as principais propriedades do PEG, destaca-se o caráter hidrofílico não-iônico, ausência de toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo. Além disso, o PEG é um dos poucos polímeros aprovados pelo FDA para uso na medicina, tais como aplicações intravenosas, oral e transdérmica (KNOP et al., 2010).

Alguns tamanhos comuns para o bloco de PEG no copolímero PLA-*b*-PEG incluem M_w de 2.000 a 20.000 g mol⁻¹. O tamanho da cadeia de PEG influencia diretamente a conformação das nanopartículas obtidas a partir desses copolímeros. Duas são as conformações mais comuns que as cadeias de PEG podem assumir, a depender da densidade superficial do bloco de PEG. Se a densidade for baixa as cadeias poliméricas assumem uma conformação emaranhada, com cadeias deitadas umas sobre as outras. No entanto, se a densidade for alta as cadeias poliméricas de PEG assumem uma conformação similar a uma escova, com as cadeias se estendendo para a superfície (GREF et al., 2000; JOKERST et al., 2011). Nanopartículas com conformação das cadeias de PEG em formato de escova geralmente têm tempos de circulação mais longos, pois os revestimentos mais densos protegem mais eficazmente do RES (MOGHIMI; SZE BENI, 2003). Partículas pequenas podem ser revestidas com cadeias de PEG variando de 20.000 a 50.000 g mol⁻¹ como forma de prevenir a excreção renal, mantendo uma alta concentração plasmática por longos períodos. Partículas grandes, na ordem de 50 a 100 nm são frequentemente revestidas com cadeias de PEG menores (3.400 a 10.000 g.mol⁻¹), pois aumentos no raio hidrodinâmico podem encurtar a meia vida

plasmática (KNOP et al., 2010). Em estudo realizado por Gref (2000), a quantidade de proteínas adsorvidas em partículas obtidas com um copolímero PLA(45K)-PEG(2K) foi 57% menor do que o observado em partículas obtidas apenas com PLA. Além disso, o aumento da cadeia de PEG de 2.000 para 5.000 g mol⁻¹ reduziu em mais de 50% a adsorção de proteínas. Já para tamanhos de cadeia de PEG maiores que 5.000 g mol⁻¹ não se observaram reduções consideráveis na adsorção de proteínas.

A síntese de copolímeros dibloco como o PLA-*b*-PEG também pode ser realizada através de ROP, quando iniciada pelo grupo hidroxila terminal do polietilenoglicol, sob catálise do Sn(Oct)₂. Quando o iniciador utilizado na reação de polimerização é um polímero contendo grupo OH terminal, ocorre a formação de um copolímero em bloco a partir dessa hidroxila. Segundo Kowalski (2000) a copolimerização de lactídeos envolve um mecanismo por inserção por coordenação em duas etapas, caso um iniciador macromolecular como o PEG esteja presente. O início e propagação da reação de polimerização envolve a interação simultânea entre três compostos: a macromolécula contendo o grupo hidroxila terminal, o monômero e o Sn(Oct)₂. Primeiramente o grupamento hidroxila da macromolécula coordena-se ao catalizador Sn(Oct)₂, levando à formação da espécie [(ROH)Sn(Oct)₂], a qual também se coordena a uma molécula de lactídeo através da carbonila. A coordenação torna a carbonila mais suscetível ao ataque nucleofílico do oxigênio proveniente da hidroxila macromolecular, levando à quebra da ligação C-O no monômero e abertura do anel. Durante cada etapa de propagação, a macromolécula com hidroxila terminal é acrescentada de uma unidade monomérica, seguida pela liberação de uma unidade de Sn(Oct)₂ na forma livre ou complexada (KOWALSKI, DUDA; PENCZEK, 2000).

A síntese de PLA-*b*-PEG tem sido relatada por diversos autores. Riley (2000), por meio de ROP, partindo de *D,L*-lactídeo, metóxi-PEG (OH-PEG-OCH₃) e Sn(Oct)₂ produziu uma série de copolímeros variando o tamanho do bloco de PLA e mantendo fixo o tamanho do bloco de PEG em 5.000 g mol⁻¹. Através da variação na proporção entre os reagentes utilizados, a razão entre o tamanho dos blocos de PLA e PEG puderam ser modulados (RILEY et al., 2001). Gref (2000) também produziu uma série de copolímeros PLA-*b*-PEG através de ROP, partindo de lactídeo e metóxi-PEG na presença de Sn(Oct)₂ como

catalizador. Diblocos com tamanho fixo de PLA e variados de PEG foram produzidos através do uso de metóxi-PEG de diferentes tamanhos (2.000, 10.000, 15.000 e 20.000 g mol⁻¹) (GREF et al., 2000). Diou (2014) obteve PLA-*b*-PEG através de ROP utilizando *DL*-lactídeo, metóxi-PEG (5.000 g mol⁻¹) como iniciador e Sn(Oct)₂ como catalizador. Basicamente, em um tubo Schlenk de 50 mL equipado com barra magnética, sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 83,26 mmol de lactídeo, 0,108 mmol de metóxi-PEG e 0,0735 mmol de Sn(Oct)₂. Após a adição de 10 mL de tolueno anidro, vedação e purga do sistema com nitrogênio, o sistema reacional foi aquecido a 110 °C por 55 minutos sob agitação contínua. A massa molar numérica média (*M_n*) obtida por RMN de ¹H para o copolímero obtido foi de 41.810 g mol⁻¹ (DIOU et al., 2014). Houvenagel (2017), realizou procedimento semelhante, porém utilizando 10,4 mmol de *D,L*-lactídeo e 0,075 mmol de iniciador. O iniciador utilizado foi metóxi-PEG (5.000 g mol⁻¹) e razão utilizada entre monômero/iniciador foi de 278:1, esperando-se um bloco com tamanho alvo de 20.000 g mol⁻¹. O copolímero obtido apresentou massa molar numérica média (*M_n*), obtida por RMN de ¹H, de 28.500 g mol⁻¹ (HOUVENAGEL et al., 2017). Outros autores, como Phan (2016) e Watanabe (2017) também realizaram procedimentos semelhantes para a obtenção de copolímeros de PLA-*b*-PEG (PHAN et al., 2016; WATANABE et al., 2017).

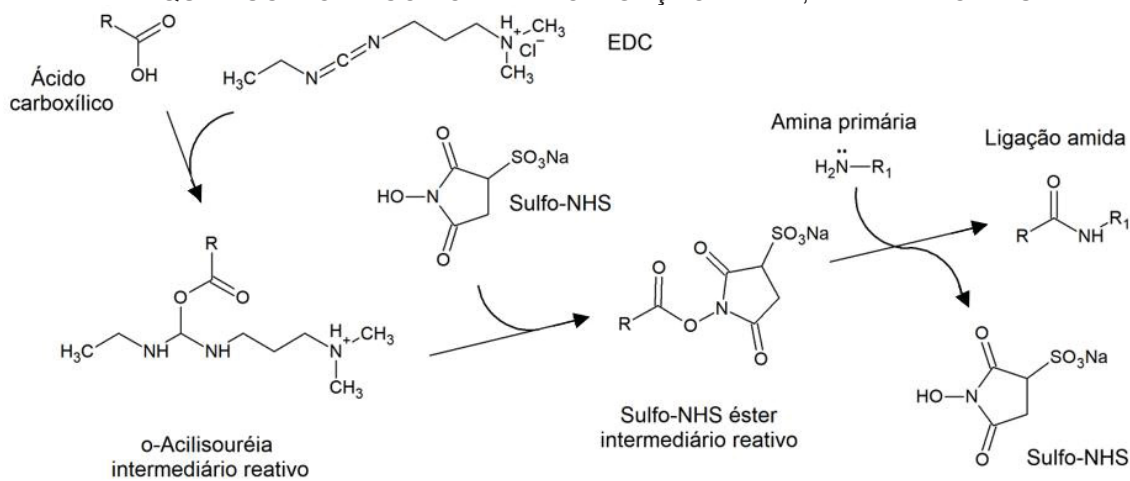
Além das propriedades conferidas pela cadeia de PEG presente no PLA-*b*-PEG, características adicionais podem ser moduladas funcionalizando-se os grupamentos terminais da cadeia de PEG opostos à hidroxila que dá início à polimerização. Diversos trabalhos têm demonstrado que a presença de moléculas biologicamente ativas na superfície de sistemas nanoparticulados podem influenciar o modo de interação com o ambiente biológico. A esse tipo de funcionalização é atribuído o nome de vetorização ativa, a qual se baseia no conceito de interações ligante-receptor, antígeno-anticorpo e outras formas de reconhecimento molecular presente em células e tecidos (ARRANJA et al., 2017; BYRNE, BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008; NICOLAS et al., 2013). Na terapia do câncer, a vetorização ativa é de particular interesse, pois reduz ou elimina a liberação de fármacos altamente tóxicos em tecidos sadios (STEICHEN, CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Dentre os alvos de superfície potencialmente aplicáveis aos sistemas vetorizados, os receptores de folato têm se mostrado um dos mais promissores. Os receptores de folato são altamente expressos em uma variedade de tumores, quando comparado a tecidos normais, podendo ser 100 a 300 vezes maior. Além disso, uma vez que o folato é necessário para a síntese de purinas e pirimidinas, a endocitose associada ao uso do folato permite a internalização e liberação dos sistemas particulados funcionalizados no citoplasma (NICOLAS et al., 2013; STEICHEN, CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Hu (2012) e Wang (2012) propuseram sistemas micelares de PLA-*b*-PEG-Folato para carreamento de fármacos anticancerígenos como a doxorubicina e diaminociclo-hexano, respectivamente. A conjugação do folato ao bloco copolimérico se deu entre o grupamento carboxílico do ácido fólico e o grupamento amino terminal da cadeia de PEG (NH₂-PEG-*b*-PLA) através de reação de conjugação utilizando reagentes EDC (cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS (N-hidroxissulfosuccinimida) (HU et al., 2012; WANG et al., 2012). Phan e colaboradores (2016) também realizou a conjugação do folato com o copolímero PLA-*b*-PEG através da conjugação com EDC/NHS, no entanto a conjugação se deu entre um grupamento terminal carboxílico do copolímero e uma amina primária do folato (PHAN et al., 2016). O EDC ou cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida é um reagente capaz de promover a ativação de grupamentos carboxílicos, os quais podem interagir com aminas primárias presentes em inúmeros compostos, formando ligações amidas. A reação com carbodiimida resulta na formação de um intermediário reativo O-acilisouréia, o qual devido a elevada reatividade promove o ataque da amina nucleofílica no grupamento carbonila do éster formado, resultando na ligação amida. Além da reação de conjugação em uma única etapa, utilizando o EDC pode-se realizar a reação em um processo de duas etapas através da coadição de N-hidroxissulfosuccinimida (NHS ou sulfo-NHS). O NHS promove o aumento da solubilidade e estabilidade do intermediário reativo durante a reação. Atualmente EDC/NHS é o conjunto de agentes mais empregado na bioconjugação em meio aquoso, sendo a ativação dos grupamentos carboxílicos mais eficiente na faixa de pH 3,5 – 4,5, enquanto a formação da ligação amida mais eficiente na faixa de pH 4,0 – 6,0 (HERMANSON, 2013; NAKAJIMA; IKADA, 1995) (Figura 11). Wang (2013)

também propôs a conjugação de um copolímero com amina terminal (DoI-PLA-PEG-NH₂) com folato através de bioconjugação com carbodiimidas (WANG et al., 2013).

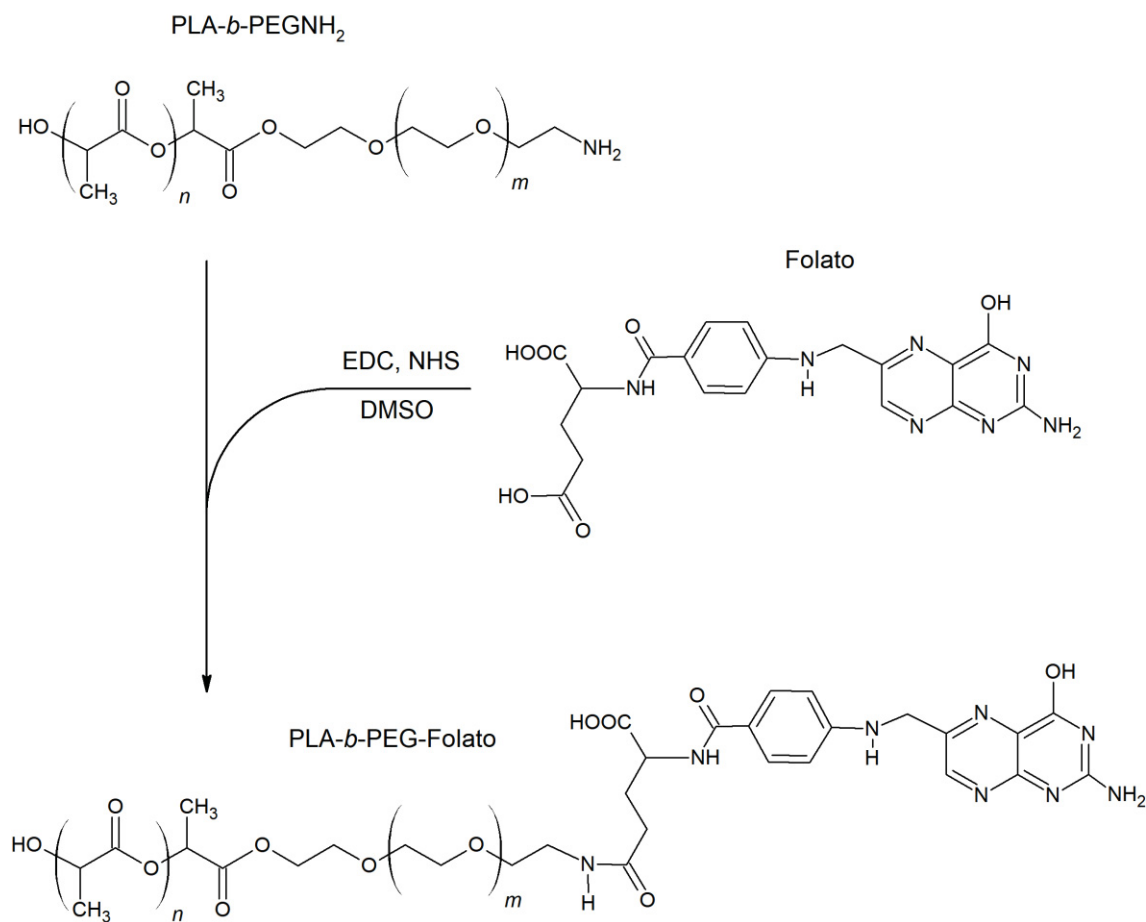
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE ENTRE GRUPAMENTO CARBOXÍLICO E EDC/NHS FORMANDO INTERMEDIÁRIOS REATIVOS O-ACILISOURÉIA SEGUIDO DE SULFO-NHS ÉSTER. NA PRESENÇA DE NUCLEÓFILO (AMINA PRIMÁRIA) OCORRE ATAQUE NUCLEOFÍLICO FORMANDO LIGAÇÃO AMIDA, LIBERANDO NHS



FONTE: Adaptado de Hermanson (2008).

Além da conjugação do folato com PLA-*b*-PEG (Figura 12), a literatura também descreveu a conjugação do folato com outros copolímeros. Por exemplo, Yoo (2004a e 2004b), Esmaeli (2008), Nie (2009) e Singh (2015) realizaram a conjugação do folato com o copolímero PLGA-*b*-PEG com cadeia de PEG funcionalizada com grupamento amino primário utilizando a conjugação com EDC/NHS (ESMAEILI et al., 2008; NIE et al., 2009; SINGH et al., 2015; YOO; PARK, 2004a; 2004b).

FIGURA 12 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PLA-*b*-PEGNH₂, FOLATO E REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG-FOLATO NA PRESENÇA DE EDC/NHS



FONTE: O Autor (2019).

3.6.2 Caracterização de copolímeros PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-FOLATO

Uma etapa fundamental e indispensável à obtenção de polímeros, trata-se da caracterização das suas propriedades físico-químicas. Dentre elas, a determinação do tamanho molecular e a estrutura química são de fundamental importância. O peso molecular de um polímero não pode ser calculado tal e qual é feito para compostos puros e de baixa massa molecular, pois polímeros se constituem em moléculas de vários tamanhos que se distribuem ao redor de um valor médio, ou seja, possuem uma distribuição molecular. A distribuição de massa molar, massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersão (IP) podem ser determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC) (DECHY-CABARET, MARTIN-VACA; BOURISSOU, 2004; WANG et al., 2018). A GPC baseia-se no princípio de

separação por tamanho de partículas. Basicamente, a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho relaciona o tempo ou volume em que a macromolécula dissolvida na fase móvel é eluída em leito cromatográfico em função do tamanho molecular. A curva de calibração é normalmente construída a partir de padrões de poliestireno com diferentes tamanhos (DECHY-CABARET, MARTIN-VACA; BOURISSOU, 2004). A técnica de RMN de ^1H permite determinar características estruturais do copolímero, tal como massa molar numérica média (M_n) e percentual de conversão do lactídeo. A M_n pode ser estimada na hipótese de que todas as cadeias poliméricas possuem o mesmo comprimento e com base nas massas utilizadas na reação de síntese e áreas integrais dos sinais característicos, através da razão entre a área integral referente ao grupo $-\text{CH}$ ($\delta \sim 5.2$ ppm) da unidade repetitiva do bloco PLA (CHCH_3COO) e da área integral referente ao grupo $-\text{CH}_2$ ($\delta \sim 3.6$ ppm) da unidade repetitiva do bloco PEG (CH_2CH_2). A conversão monomérica também pode ser calculada através da razão entre a área integral referente ao grupo $-\text{CH}$ ($\delta \sim 5.05$ ppm) do monômero e da área integral referente ao grupo $-\text{CH}$ ($\delta \sim 5.2$ ppm) da unidade repetitiva do bloco PLA. Nesse caso utiliza-se o polímero antes e após a purificação (DIOU et al., 2014; GOURDON et al., 2017; HOUVENAGEL et al., 2017; WANG et al., 2018; XIE et al., 2017). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) consiste na avaliação da quantidade de calor absorvido ou liberado por uma amostra e um material de referência, em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura. Utilizando essa técnica é possível observar os efeitos do calor associado com alterações físicas e químicas do polímero, como por exemplo: mudanças de fase e reações de desidratação, degradação e óxido redução. As características mais importantes que podem ser determinadas por DSC compreendem a transição vítrea (T_g) (ganho de mobilidade em domínios amorfos), temperatura de fusão (T_{fus}), temperatura de cristalização (T_c), bem como as energias envolvidas em cada um desses eventos térmicos (GOURDON et al., 2017; PHAN et al., 2016; WANG et al., 2018). A identificação de grupos funcionais nos polímeros sintetizados, como a ligação entre blocos de PLA e PEG, pode ser obtida através da aplicação da espectroscopia de infravermelho (FTIR). Tal comparação é realizada pela comparação direta entre espectros de absorção obtidos para os monômeros e

copolímeros sintetizados (AHMED; DISCHER, 2004; KIM et al., 1999; PHAN et al., 2016; WANG et al., 2018).

No caso de copolímeros funcionalizados com grupamentos específicos, como é o caso do PLA-*b*-PEG-Folato, torna-se importante definir qual o percentual de grupamentos folato conjugado ao copolímero. O percentual de conjugação está diretamente relacionado ao número de grupamentos folato que estarão expostos na superfície dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir do copolímero, influenciando o grau de vetorização. A espectrofotometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e possibilidade de quantificação do folato mesmo conjugado a polímeros (PHAN et al., 2016; WANG et al., 2018). A partir da leitura da absorbância da amostra pode-se determinar a concentração a amostra, fundamentado na lei de Lambert-Beer (SKOOG, HOLLER; CROUCH, 2017).

3.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A caracterização físico-química de nanopartículas, engloba a avaliação da morfologia, tamanho médio e índice de polidispersão (IP), potencial zeta (ζ), eficiência de encapsulação, cinética de liberação do fármaco *in vitro* e estabilidade em função do tempo armazenado.

Em relação às características morfológicas, as técnicas de microscopia eletrônicas como a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão são as mais comuns. Basicamente, na microscopia eletrônica a amostra é bombardeada por um fluxo de elétrons e os efeitos de espalhamento (MEV) ou transmissão (MET) resultantes são detectados e convertidos em imagens ampliadas. Outras técnicas como a microscopia de força atômica (AFM) também possibilitam informações interessantes sobre a forma e tamanho de nanopartículas (KUMAR; DIXIT, 2017).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a técnica mais usada para avaliação do perfil morfológico de nanopartículas, possibilitando uma magnificação na faixa de 10^5 a 10^6 (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011). No entanto, uma vez que nessa técnica é necessário um tratamento prévio de

fixação e utiliza-se alto vácuo durante a análise, para nanocápsulas a MEV pode apresentar limitações por alterar a forma. Além disso, a MEV não permite distinguir entre o material da cápsula e do interior, uma vez que apenas observam-se imagens da superfície (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011; KUMAR; DIXIT, 2017; RUOZI et al., 2011). Ao contrário da MEV, a microscopia de transmissão (MET) não permite a observação da superfície das nanopartículas. Porém possibilita a magnificação em escalas muito maiores. A MET pode fornecer informações relacionadas à confirmação da presença de estrutura nuclear e cápsula, no caso de nanocápsulas, devido à diferença de contraste observada entre os materiais que compõem as distintas partes. A MET também possibilita estimar tamanho geral das nanopartícula, espessura da cápsula, presença de revestimento uniforme ou não (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011). Tanto a MEV como a MET podem ser utilizadas com técnicas complementares. A MEV quando acoplada à espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS do inglês *energy dispersive spectroscopy*), fornece informações sobre a composição elementar da superfície das nanopartículas. A MET quando acoplada à espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS do inglês *electron energy loss spectroscopy*) ou com espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) é usada para fornecer informações valiosas sobre a estrutura do núcleo/cápsula e composição do material (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011).

O tamanho de nanopartículas é uma das informações mais básicas e um dos principais determinantes da biodistribuição e retenção nos tecidos-alvo. A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS do inglês *dynamic light scattering*) é comumente usada para a determinação do tamanho hidrodinâmico de partículas e cálculo do IP), quando em suspensões coloidais. Por essa técnica, o tamanho de uma nanopartícula é considerado equivalente ao tamanho de uma esfera rígida hipotética, que se difunde de igual forma que as nanopartículas sob análise. O DLS avalia o espalhamento da luz causado pelo movimento Browniano das nanopartículas em suspensão e relaciona o coeficiente de difusão translacional com o tamanho, de acordo com a equação de Stokes-Einstein (CHO et al., 2013). Como resultado obtém-se o tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão. O IP é um parâmetro adimensional calculado a partir de uma análise cumulativa da função de auto

correlação de intensidade medida. O IP varia de 0 a 1, em que 0 representa alta homogeneidade e 1 representa extrema heterogeneidade (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011). Um valor IP de 0,1 a 0,25 indica uma distribuição de tamanho estreita. Já um valor de IP maior que 0,5 indica uma distribuição ampla (LU et al., 2011). Embora o DLS forneça uma estimativa simples e rápida do tamanho das partículas, vários estudos sugerem limitações inerentes do DLS. Por exemplo, DLS é relativamente falho em analisar a distribuição de tamanho de partículas com perfil multimodal (HOO et al., 2008; LU et al., 2011), pois o sinal das partículas menores é suprimido pelo sinal das partículas maiores uma vez que a intensidade do sinal de uma partícula esférica com raio r é proporcional a r^6 . Partículas não esféricas podem ser analisadas utilizando-se DLS multi ângulo (KUMAR; DIXIT, 2017).

Características de carga superficial de nanopartículas são de extrema importância, uma vez que influenciam diretamente no comportamento das nanopartículas com o meio em que se encontram (POWERS et al., 2006). Quando em suspensão coloidal essas características de carga podem ser determinadas através da medida do potencial zeta (KUMAR; DIXIT, 2017). Nanopartículas possuem uma carga intrínseca em sua superfície, a qual atrai camadas de contra-íons do meio, uma camada mais interna e fortemente ligada à superfície da nanopartícula (camada de Stern) e uma mais externa fracamente ligada à superfície (camada difusa). O potencial zeta representa o potencial na interface da camada externa (camada difusa) do plano de deslizamento em relação ao meio, ou seja, o potencial zeta é a diferença de potencial na interface entre o meio de dispersão e a camada estacionária difusa da nanopartícula dispersa (CHO et al., 2013; KUMAR; DIXIT, 2017). Geralmente, partículas com potencial zeta mais positivo que +30 mV ou mais negativo que -30 mV possuem maior estabilidade coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (NEVES et al., 2013). Dispersões coloidais com valor de potencial zeta entre -30 mV e +30 mV, eventualmente se aglomeram devido a interações interpartículas, incluindo as interações de Van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (CHO et al., 2013).

A medição do potencial zeta depende da força e valência dos contra-íons contidos na suspensão de nanopartículas. Íons de alta força iônica e alta valência

comprimem a dupla camada elétrica (Stern e difusa), resultando na redução do potencial zeta (BRANT, LECOANET; WIESNER, 2005; WIDEGREN; BERGSTRÖM, 2002). O pH e a concentração de íons de hidrogênio no meio também influenciam o potencial zeta. Quando a suspensão tem caráter ácido, as nanopartículas adquirem mais carga positiva e vice-versa. Portanto, um valor de potencial zeta sem indicação do pH e composição do meio é um número virtualmente insignificante (CHO et al., 2013).

Idealmente, um sistema nanoparticulado desenvolvido para liberação de um fármaco deve apresentar bom rendimento, alta eficiência de encapsulação e alta capacidade de carga. Tais parâmetros dependem das características do processo de obtenção, fármaco (solubilidade ou dispersividade no polímero, hidrofobicidade/hidrofilicidade, peso molecular) e do polímero (peso molecular, cristalinidade, composição, presença de grupos funcionais) (MOHANRAJ; CHEN, 2006). O rendimento representa o quanto de nanopartículas é obtido a partir da quantidade utilizada de polímero e fármaco, sendo calculado dividindo-se a massa obtida de nanopartículas pela massa total de polímero e fármaco utilizado (Equação 1). A eficiência de encapsulação (EE) percentual representa a fração de fármaco que está associada às nanopartículas, em relação à quantidade total de fármaco adicionada no processo de fabricação (Equação 2). A EE (%) é calculada quantificando-se o quanto de fármaco está associado às nanopartículas e dividindo-se esse valor pelo total de fármaco utilizado no processo de fabricação. Já a capacidade de carga (LC) percentual é a quantidade de fármaco carregado por unidade de peso de nanopartículas, indicando a porcentagem de massa da nanopartícula que representa o fármaco encapsulado (Equação 3). A LC (%) é calculada dividindo-se a quantidade de fármaco associado às nanopartículas pela massa total das nanopartículas (PAPADIMITRIOU; BIKIARIS, 2009).

EQUAÇÃO 1 - DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RENDIMENTO

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso das NPs/MCs}}{\text{Peso do Polímero} + \text{Peso do POH}} \times 100$$

NOTA: NPS – nanopartículas; MCS – micropartículas; POH – álcool perfílico.

EQUAÇÃO 2 - DETERMINAÇÃO DA EFICIENCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FORMA DIRETA

$$EE (\%) = \frac{POH \text{ contido nas NPs/MCs}}{POH \text{ adicionado na formulação}} \times 100$$

NOTA: NPS – nanopartículas; MCS – micropartículas; POH – álcool perfílico.

EQUAÇÃO 3 - DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE CARGA

$$LC (\%) = \frac{\text{Peso do POH contido nas NPs/MCs}}{\text{Peso das NPs/MCs}} \times 100$$

NOTA: NPS – nanopartículas; MCS – micropartículas; POH – álcool perfílico.

A concentração de fármaco associado às nanopartículas (EE (%)) pode ser quantificada diretamente (Equação 2) ou indiretamente. A determinação da EE (%) de forma direta envolve a quantificação do fármaco de interesse, por uma técnica analítica adequada, em uma certa massa de nanopartículas. Nessa técnica, basicamente, é necessário separar adequadamente as nanopartículas dos demais componentes da formulação presentes no sobrenadante, principalmente o fármaco livre não encapsulado. Tal separação pode ser feita através de centrifugação, diálise e cromatografia por exclusão. A centrifugação tem como vantagens a possibilidade de obter ambas as frações sem diluições adicionais, no entanto para uma adequada separação são necessárias altas velocidades de centrifugação e períodos longos para que a sedimentação ocorra adequadamente. Após se obter apenas as nanopartículas, é necessário solubilizá-las para que o fármaco seja extraído da matriz polimérica e então adequadamente quantificado. Nesse caso, há consumo de material produzido, o que se torna uma desvantagem. Já na quantificação indireta da EE (%), a quantidade de fármaco associado às nanopartículas é calculada indiretamente através da análise do sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação das formulações. A quantidade livre de fármaco quantificada no sobrenadante é subtraída da quantidade total teórica utilizada no processo de produção, sendo o valor residual associado à quantidade incorporada nas nanopartículas. Como desvantagens, a técnica indireta pode embutir erros devido as perdas

relacionadas ao processo de obtenção do sobrenadante ((SCHAFFAZICK et al., 2003).

EQUAÇÃO 4 - DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FORMA INDIRETA

$$EE (\%) = \frac{POH \text{ adicionado na formulação} - POH \text{ no sobrenadante}}{POH \text{ adicionado na formulação}} \times 100$$

NOTA: NPS – nanopartículas; MCS – micropartículas; POH – álcool perfílico.

A liberação *in vitro* de um fármaco nanoencapsulado é um parâmetro importante a ser caracterizado, uma vez que a encapsulação permite a modulação de propriedades como maior estabilidade, melhor biodistribuição e biodisponibilidade seletiva no local de ação pretendido (CHO et al., 2013). No caso de nanopartículas poliméricas direcionadas ao tratamento de câncer, em que o efeito EPR pode melhorar significativamente a terapia, a nanoformulação deve ser otimizada de forma que o fármaco não seja liberado prematuramente, permitindo o acúmulo no local de destino. Nestes casos, as taxas de liberação do fármaco *in vitro* são muito importantes e geralmente estão relacionadas à segurança, eficácia e estabilidade da nanoformulação *in vivo* (CHO et al., 2013).

Os mecanismos de liberação do fármaco nano encapsulados variam de acordo com diversos parâmetros, destacando-se o tipo de nanopartícula (nanoesferas ou nanocápsulas), composição polimérica, espessura da capsula polimérica, tamanho da nanoesfera, solubilidade do fármaco, fármaco está associado fisicamente ou conjugado quimicamente ao polímero (KAMALY et al., 2016). Para nanopartículas poliméricas, a cinética de liberação está associada ao mecanismo pelo qual a molécula de fármaco é transportada da posição inicial em que se encontra na matriz polimérica para o ambiente em que a nanopartícula se encontra.

Os principais mecanismos de liberação de um fármaco nanoencapsulado basicamente envolvem os seguintes processos: (I) dessorção do fármaco ligado à superfície da nanopartícula polimérica. Perfis de liberação com um início rápido estão associados à fração de fármaco adsorvido ou fracamente ligados na superfície da nanopartícula; (II) erosão da superfície polimérica sentido interior,

diminuindo lentamente o tamanho da nanopartícula e liberando o fármaco disperso na matriz. Nesse caso a taxa de erosão superficial é superior à taxa de penetração do líquido e formação de poros e a liberação ocorre de forma sustentada; (III) formação de poros através da matriz polimérica e difusão das moléculas de fármaco através da rede de poros. Esse processo é governado por movimentos aleatórios do fármaco e impulsionado por gradientes de potencial químicos e convecção produzidos por pressão osmótica. A liberação das moléculas do fármaco através da matriz polimérica leva a um período de retardo inicial controlado pela baixa difusão e se intensifica com aumento dos poros pela erosão (CHO et al., 2013; HOFFMAN, 2008; KAMALY et al., 2016; LU et al., 2011).

Em nanopartículas poliméricas o perfil de liberação mais comum são sistemas bifásicos ou trifásicos devido à heterogeneidade de mecanismos de liberação. A fase I de um perfil de liberação normalmente está relacionada à dessorção rápida das moléculas de fármaco na superfície. A fase II do perfil de liberação é uma fase de liberação lenta controlada pela difusão do fármaco através da matriz polimérica ou através dos poros existentes e é simultânea à hidrólise e degradação do polímero. A fase III pode ser uma fase de liberação mais rápida, à medida que a erosão se intensifica (FREDENBERG et al., 2011).

O perfil de liberação de fármaco em nanopartículas polimérica pode ser estudado por pelo menos duas diferentes formas: (I) mantendo-se as nanopartículas dispersas no meio de dissolução realizando-se amostragens em determinados períodos. A alíquota é centrifugada ou filtrada para separação do fármaco liberado, as nanopartículas residuais são suplementadas com meio de dissolução fresco e incubadas novamente para amostragem seguinte. Embora este método possa ser realizado com uma pequena quantidade de amostras e equipamentos analíticos simples, existem várias deficiências. O processo é lento e ineficiente, o que os torna menos adequados para o estudo de nanopartículas que liberam rapidamente o fármaco. Além disso, a força centrífuga ou a tensão de cisalhamento durante a filtração necessária para a separação, podem alterar a cinética de liberação; (II) Na difusão por membrana de diálise, a amostra é mantida em saco de diálise dentro do meio de dissolução. Nesse caso a liberação depende da difusão contínua através da membrana de diálise para o meio, podendo atenuar a liberação do fármaco como uma barreira de difusão ou

uma superfície de adsorção. As vantagens deste método são que as nanopartículas não estão sujeitas a processos invasivos de separação e a amostragem é rápida e simples. Esse método deve ser acompanhado por um experimento de controle com um medicamento livre para explicar o efeito de membrana (CHO et al., 2013).

A estabilidade de nanopartículas é definida como a habilidade em manter suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. O destino *in vivo* de nanopartículas é em grande parte determinado por sua capacidade de evitar a degradação prematura e manter o tamanho, evitar agregação, manter funcionalização superficial e reter a carga útil do fármaco. Problemas de instabilidade resultam em biodistribuição alterada e liberação prematura do fármaco, comprometendo a eficácia do sistema de entrega. Dessa forma, a avaliação da estabilidade de sistemas nanoparticulados mediante o monitoramento de parâmetros físico-químicos é um componente essencial para avaliar o potencial de nanossistemas (CHO et al., 2013; LU et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O tamanho de partícula, morfologia, potencial zeta e teor de fármaco são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas, após períodos de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, formas farmacêuticas líquidas são propensas à instabilidade físico-química e microbiológica, dessa forma a desidratação das suspensões de nanopartículas tem sido realizada através de operações de liofilização. No entanto, em suspensões de nanocápsulas, esta operação pode representar perda do fármaco encapsulado devido a alterações na estrutura da cápsula (SCHAFFAZICK et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes

DL-Lactídeo (> 99,5%) foi obtido da Polysciences Inc. (Warrington, PA, USA). 1-octanol (>99%), 2-etil-hexanoato de estanho (> 92,5%), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (> 98%), álcool perílico (> 96,0%), álcool polivinílico (Mw 31 kDa, 88% hidrolisado), cloreto de sódio (> 99%), colato de sódio mono-hidratado (> 97,0%), clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8%, contendo trimetilsilano a 0,03% v/v), dimetilsulfóxido (> 99%), fosfato de potássio monobásico (> 99,9%), fosfato de sódio dibásico (> 99,95%), poli(etilenoglicol) metil éter (OH-PEG-OCH₃, Mn 5.000 g mol⁻¹), tetra-hidrofurano anidro grau CLAE (> 99,9%), sulfato de estreptomicina, tolueno anidro (> 99,8%) e vermelho do nilo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido clorídrico (36,5 – 38%), da Mallinckrodt Baker (Edo. de Méx. México). Ácido fórmico (> 99%), da Carlo Erba Reagenti (Rodano, Itália). Acetonitrila grau CLAE, da Tédia (Fairfield, USA). Água ultrapura, Millipore (Milford, EUA). Etanol (95%), da FMaia (São Paulo, Brasil). Formiato de amônio (> 97%), da Acros Orgânicos (New Jersey, USA). Hidróxido de sódio (99%), da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Metanol grau CLAE, da Tédia (Fairfield, USA). Peróxido de hidrogênio (29%), da Labsynth (São Paulo, Brasil). Poli(etilenoglicol) α -amino, ω -hidroxil (OH-PEG-NH₂, Mn 5.000 g mol⁻¹) foi obtido da Iris Biotech GMBH (Marktredwitz, Germany). Padrões de peso molecular de poliestireno (1000 Da a 1,9 MDa, Viscotek, USA). Meio DMEN alta glucose e soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen) da Cultilab (Campinas, Brasil). Todos os demais solventes utilizados no estudo foram de alta pureza e adquiridos da Carlo Erba Reagenti (Rodano, Italy).

4.2 Consumíveis e equipamentos

- Agitador magnético C-MAG HS4, IKA® (Staufen, Alemanha);
- Agitador magnético MAG15, Marte Científica (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica, Excellence Plus XP 205 (precisão de 0,01 mg), Mettler Toledo (Columbus, EUA);

- Banho ultrassônico 2510, Branson (Danbury, EUA);
- Centrifuga 5810R, Eppendorf (Hamburgo, Germany);
- Coluna GPC KF-806M de 8,0 mm x 300 mm, com 10 µm de tamanho de partícula e limite de exclusão molecular de 2×10^7 g mol⁻¹ (*Shodex, Tokio, Japan*);
- Coluna XBridge C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Cromatógrafo líquido Agilent 1100, equipado com bomba quaternária (G1379A), degaseificador (G1316A), forno de coluna (G1316A), detector DAD (G1315B) (Wilmington, EUA);
- Cromatógrafo líquido Viscotek, modelo GPCmax VE 2001, equipado com um sistema detector de índice de refração (RI) modelo Viscotek VE 3580 (*Viscotek, Houston, USA*);
- Disruptor ultrassônico Sonics Vibra-Cell VCX 750, (Newton, USA);
- Espectrofotômetro Agilent UV-Vis 8453, Agilent (Milford, EUA);
- Espectrofotômetro com leitor microplacas modelo Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA);
- Espectrofotômetro Infravermelho Alpha FT-IR, módulo Alpha-P Bruker (Karlsruhe, Germany);
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance III HD 400, Bruker (Karlsruhe, Germany);
- Filtros de membrana: fluoreto de polivinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 e 0,45 µm de poro, respectivamente, Millipore Millex (Billerica, EUA);
- Liofilizador Modulyo Freeze Drying System, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA);
- Membrana de diálise de celulose, MWCO, 12 KDa (St. Louis, USA);
- Metalizadora Au e C BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater, Baltec (Balzers, Liechtenstein);
- Microscópio de Varredura a Laser Confocal Multifóton, modelo A1 MP+, NIKON Instruments Inc. (Toquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II, Jeol (Tóquio, Japão);

- Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6360-LV, Jeol (Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Varredura TESCAN VEGA3 LMU, Tescan (Kohoutovice, República Tcheca);
- Nano DLS – Dynamic Light Scattering, Brookhaven Instruments (Holtsville, USA);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial, modelo DSC-60 (*Shimadzu, Japan*);
- Sistema de determinação de potencial zeta, Stabino® Particle Charge Mapping, Particle Metrix GmbH (Meerbusch, Germany);
- Pré-coluna XBridge C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 μm), Waters (Milford, EUA);
- Purificador de água Milli-Q Millipore A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Vórtex digital, Genie 2, Scientific Industries Inc. (Bohemia, EUA);
- Tensiômetro OCA15⁺, DataPhysics (Filderstadt, Germany) equipado com software SCA20;
- Tubo para centrifugação de polipropileno, Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça);

4.3 Síntese polimérica do PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato

O copolímero PLA-*b*-PEG foi obtido pelo método de polimerização por abertura de anel usando *DL*-lactídeo na presença de 2-etil-hexanoato de estanho como catalizador (BÖHMER et al., 2006; LEE et al., 2001) e polietilenoglicol metil éter com uma hidroxila terminal (M_n 5.000 g mol⁻¹) como iniciador da reação (DIOU et al., 2014; HOUVENAGEL et al., 2017). Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com tolueno e secas sob fluxo de ar até completa remoção do solvente de limpeza. Imediatamente antes do uso, as vidrarias foram secas utilizando pistola de ar quente sob vácuo. Toda a etapa de polimerização foi realizada sob atmosfera de nitrogênio ou vácuo utilizando linha Schlenk. Inicialmente, uma solução de catalizador a 10 mg mL⁻¹ foi preparada em tolueno anidro. Em um tubo Schlenk de 10 mL equipado com barra magnética, foram adicionados o *DL*-lactídeo (1,5 g / 10,39 mmol) e o iniciador de reação polietilenoglicol metil éter com hidroxila terminal (375 mg / 0,075 mmol). Após o

tubo Schlenk ser fechado com septo de borracha foi realizada a purga da atmosfera (três ciclos de vácuo/N₂) e adicionados 2 mL da solução de catalizador com auxílio de seringa de vidro através do septo. Após nova purga da atmosfera do tubo (três ciclos de vácuo/N₂), o mesmo foi mantido em banho de óleo a 130°C para polimerização. A reação foi mantida por 55 minutos (início após solução se tornar límpida) sob agitação magnética a 300 rpm (barra magnética 10 x 3 mm, agitador magnético *C-MAG HS4*). Após este período reacional a solução foi resfriada por imersão em banho de gelo por 10 minutos. O tolueno foi evaporado mantendo-se o tubo Schlenk sob vácuo por 1 hora. A purificação do copolímero se deu através da dissolução do resíduo reacional em 5 mL de clorofórmio, seguida da precipitação por gotejamento em 50 mL de éter dietílico previamente resfriado (erlenmeyer contendo éter dietílico mantido em banho de gelo e sob agitação magnética a 600 rpm durante gotejamento (barra magnética 30 x 5 mm, agitador magnético *MAG15*)). Após completo gotejamento, a mistura reacional foi mantida por 60 minutos sob agitação para completa precipitação do polímero. O sobrenadante etéreo foi descartado e o polímero aderido ao erlenmeyer foi dissolvido em 50 mL de acetona e posteriormente precipitado em 200 mL de água gelada, sob constante agitação magnética. Após agitação por 12 horas e completa evaporação da acetona, a solução aquosa contendo o polímero foi centrifugada (4.500 × g, 30 min, 20°C) e o polímero precipitado foi separado e liofilizado.

A síntese do copolímero PLA-*b*-PEG-Folato foi obtida em duas etapas, baseado no descrito por ESMAEILI et al. (2008), HU et al. (2012), NIE et al. (2009), SINGH et al. (2015), WANG et al. (2012), YOO; PARK (2004a) e YOO; PARK (2004b). Inicialmente foi sintetizado e purificado PLA-*b*-PEG-NH₂ de maneira idêntica ao descrito para o PLA-*b*-PEG, porém utilizando-se as seguintes quantidades e reagentes: *DL*-lactídeo (750 mg / 5,19 mmol), polietilenoglicol com uma amina primária terminal (187,5 mg / 0,025 mmol) e 0,67 mL de solução de catalizador (10 mg mL⁻¹). Na segunda etapa foi realizada a conjugação do folato ao PLA-*b*-PEG-NH₂. Para tanto, 25,39 mg (0,0575 mmol) de folato foram dissolvidos em 2,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos sob agitação magnética a 600 rpm (barra magnética 10 x 3 mm, agitador magnético *MAG15*) ao abrigo da luz, a temperatura ambiente e em atmosfera de nitrogênio por 3 horas. Após, foram adicionados 12,12 mg (0,0632 mmol) de EDC

e 14,56 mg (0,1265 mmol) de NHS e mantidos sob agitação por 21 horas ao abrigo da luz, a temperatura ambiente e em atmosfera de nitrogênio. A razão entre folato, EDC e NHS utilizada foi de 1:1,1:2,2. Após etapa de agitação, foram adicionados por gotejamento 718,75 mg (0,0288 mmol) de PLA-*b*-PEG-NH₂ e o sistema mantido sob agitação magnética (600 rpm), ao abrigo da luz, a temperatura ambiente e em atmosfera de nitrogênio por um período de 18 horas. Previamente à adição do copolímero por gotejamento, o mesmo foi completamente dissolvido em 3,5 mL de DMSO sob agitação magnética. A purificação do copolímero PLA-*b*-PEG-Folato foi realizada gotejando-se a solução de DMSO em 50 mL de água previamente resfriada (erlenmeyer contendo água mantido em banho de gelo e sob agitação magnética). O resíduo reacional foi centrifugado (4.000 × g, 30 min, 4°C), o precipitado ressuspensionado em água e centrifugado uma segunda vez. O polímero precipitado foi congelado e liofilizado, após dissolvido em 5 mL de diclorometano e centrifugado (4.000 × g, 30 min, 4°C) e o sobrenadante gotejado em 50 mL de água gelada sob agitação magnética a 300 rpm (barra magnética 30 x 5 mm, agitador magnético MAG15). Após, a mistura foi mantida sob agitação magnética durante 12 horas para completa evaporação do solvente orgânico. Por fim o polímero purificado foi centrifugado, separado e liofilizado. Toda a etapa de purificação foi realizada ao abrigo da luz.

4.4 Caracterização polimérica do PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato

O percentual de conversão monomérica e massa molar numérica média (M_n) dos copolímeros foram estimadas por espectroscopia de RMN de ¹H. Alíquotas de aproximadamente 10 mg de polímero foram diluídas em 600 µL de CDCl₃ contendo 0,05% de TMS e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos a temperatura de 20°C, com acúmulo de oito varreduras, tempo de relaxação de 1 s, com largura espectral \cong 9,0 ppm e 64 K pontos, proporcionando uma resolução de 0,05 Hz usando probe multinuclear de detecção direta de 0,05 mm. Os pesos moleculares foram estimados com base na hipótese de que todas as cadeias poliméricas possuem o mesmo comprimento. A concentração molar do PLA-*b*-PEG foi calculada pela integração do sinal em 5,20 ppm, correspondente ao hidrogênio do metino

$[CHCH_3COO]_n$ do bloco de PLA e normalização com a área do singlete em 3,66 ppm, correspondente ao sinal dos hidrogênios do metileno $[OCH_2CH_2]_m$ referente ao PEG. A massa molar foi deduzida do cálculo da concentração molar. A conversão monomérica também foi calculada através da razão entre a área integral referente ao grupo $-CH(\delta \sim 5,05 \text{ ppm})$ do monômero e da área integral referente ao grupo $-CH(\delta \sim 5,20 \text{ ppm})$ da unidade repetitiva do bloco PLA, na amostra obtida anteriormente à purificação do copolímero, considerando a massa contida no tubo de RMN.

A distribuição de massa molar, massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersão (IP) foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC). Utilizou-se uma coluna GPC KF-806M de 8,0 mm x 300 mm, com 10 μm de tamanho de partícula e limite de exclusão molecular de $2 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$. Como eluente e diluente de preparo de amostra foi utilizado o tetra-hidrofurano grau CLAE, filtrado e degaseificado, a um fluxo de 1 mL min^{-1} , com temperatura de forno de coluna a 40°C . A curva de calibração foi gerada pelo software OmniSEC (Viscotek, Houston, USA) a partir dos valores de M_p (*peak molecular weight*) de padrões de poliestireno (Viscotek) com massas molares na faixa de 1.080 a 1.900.000 g mol^{-1} , preparada previamente no mesmo diluente das amostras. Foram injetados 100 μL de soluções amostra a uma concentração de 5 mg mL^{-1} , previamente filtradas em filtro de membrana PTFE com 0,45 μm de tamanho de poro.

A determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) foi realizada em um sistema de calorimetria exploratória diferencial sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Aproximadamente 3 mg de amostra foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em microcadinhos de alumínio e, então, submetidas a rampa de aquecimento (faixa de temperatura de $20^\circ\text{C} - 200^\circ\text{C}$) para a determinação da T_g . Antes do início do processo, foi acondicionado no calorímetro um microcadinho vazio, idêntico ao da amostra, que foi utilizado como referência. A compilação dos resultados obtidos foi realizada em *Software Setsoft 2000*.

A técnica de espectrofotometria na região do infravermelho (FTIR) foi utilizada para caracterizar a presença da ligação entre os blocos PLA, PEG e folato. Os espectros das amostras do monômero, reagentes de partida e copolímeros foram obtidos em um espectrômetro na região do infravermelho,

utilizando módulo de reflectância atenuada (ATR) com cristal de diamante. Os espectros foram adquiridos no modo transmitância, à temperatura de 20°C e umidade de 45 – 55%, no estado sólido, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com acúmulo de 24 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

A técnica de espectrofotometria na região do UV-vis foi utilizada para se determinar o percentual de conjugação do folato no copolímero. Uma curva de calibração foi construída através de diluições seriadas de folato livre em DMSO, contemplando a faixa de concentração de 0,01 a 0,05 mg mL^{-1} . Uma quantidade de 10 mg de PLA-*b*-PEG-Folato foi dissolvida em 1,5 mL de DMSO e diluída para concentração dentro do intervalo da curva de calibração. As absorbâncias foram medidas a 363 nm.

4.5 Avaliação do álcool perílico

A determinação da solubilidade do álcool perílico em água ultrapura foi realizada adicionando-se excesso do fármaco (10,0 mg) em 10 mL de meio solubilizante submetendo-se à agitação magnética a 300 rpm por 24 horas. A amostra foi filtrada através de membrana PVDF com 0,45 μm de tamanho de poro e analisada por CLAE para a determinação da quantidade dissolvida. A determinação foi realizada em triplicata.

Adicionalmente, a concentração de saturação do fármaco em solução tampão fosfato salino 10 mmol L^{-1} (PBS) pH 7,4, foi determinada de igual forma que para a água, a fim verificar a adequabilidade do meio e definir condições do ensaio de liberação *in vitro*.

4.6 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para doseamento do álcool perílico

4.6.1 Preparo da solução estoque de álcool perílico

Uma solução de POH foi preparada através da pesagem em balança analítica, corrigindo-se a massa de acordo com o teor declarado. Posteriormente o padrão foi solubilizado em metanol sob agitação em vórtex por 1 minuto e

diluindo com mesmo solvente até a concentração de 10 mg mL⁻¹. A solução foi mantida refrigerada a 4°C e protegida da luz.

4.6.2 Obtenção de amostras forçadas à degradação

O estudo de degradação forçada e desenvolvimento do método indicativo de estabilidade foi realizado baseado nas recomendações preconizadas pelo ICH, como Q1A(R2) 2003 - *stability testing of new drug substances and products* (ICH, 2003) e Q3A(R2) 2006 - *Impurities in new drug substances* (ICH, 2006) e ANVISA, como RDC n° 53 de 04 de dezembro de 2015 - *parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos* (ANVISA, 2015a) e Guia n° 04/2015 Versão 01 - *obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos* (ANVISA, 2015b). As condições de estresse forçado avaliadas foram umidade elevada, meio ácido, meio básico, meio oxidativo, foto exposição e térmica seca, sendo que:

- Umidade (térmica úmida), utilizando água e aquecimento a 60°C;
- Ácido, utilizando-se uma solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹;
- Alcalina, utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹;
- Oxidante, usando-se peróxido de hidrogênio 15%;
- Fotoexposição, expondo o produto a luz visível, exposição 1,2 milhões de lux.hora e 200 w h m⁻²;
- Térmica seca, sendo realizado na umidade mais baixa possível a 60°C;

Partindo-se da solução mãe (10 mg mL⁻¹), sete diferentes soluções com concentração de 1 mg mL⁻¹ foram preparadas por diluição. Destas, uma foi considerada como “amostra controle” e as demais foram submetidas às condições de estresse acima citadas. A solução considerada como “amostra controle” e as soluções referentes às condições térmica seca e foto exposição foram diluídas com 100% de metanol. A solução referente à condição de umidade foi diluída com uma mistura de água:metanol (1:1 v/v) de forma a se obter um meio com excesso de umidade. As soluções referentes às condições

ácida, alcalina e oxidante foram diluídas com metanol e uma quantidade de solução de agente estressante ($\text{HCl } 5 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 30%), de forma a se obter as concentrações de, exatamente, 1 mol.L^{-1} para HCl e NaOH e 15% para peróxido de hidrogênio.

As soluções a 1 mg mL^{-1} foram mantidas em repouso sob exposição do agente estressante e, após período de exposição, cada solução foi diluída até uma concentração final de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (solução analítica). Nesta segunda diluição, o diluente utilizado foi o metanol. No caso das soluções mantidas em condição ácida e alcalina, previamente à diluição com metanol, foi realizada a neutralização. À exceção da amostra submetida à condição de foto exposição, todas as demais foram protegidas da luz. Antes das injeções no cromatógrafo todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$ de poro).

4.6.3 Otimização dos parâmetros cromatográficos

A otimização da cromatografia foi realizada considerando-se o comportamento cromatográfico do álcool perílico e seus produtos de degradação em uma coluna cromatográfica XBridge: C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $3,5 \text{ }\mu\text{m}$). Foram avaliados: diferentes fluxos da fase móvel, na faixa de $0,3 - 0,4 \text{ mL min}^{-1}$; diferentes solventes orgânicos na composição da fase móvel (metanol e/ou acetonitrila); diferentes proporções de solventes orgânicos (metanol e/ou acetonitrila), variando na faixa de 15 – 50%; diferentes temperaturas do forno de coluna, na faixa de $25 - 40^\circ\text{C}$; diferentes volume de injeção, na faixa de 5 – 40 μL .

Os ensaios foram realizados com soluções de “amostra controle” e as forçadas à degradação, que apresentaram picos correspondentes as degradações. A seleção do sistema cromatográfico foi baseada nos resultados de melhor perfil cromatográfico com base em parâmetros cromatográficos como: fator de capacidade, resolução, relação sinal/ruído e avaliação de pureza de pico.

4.6.4 Avaliação da estabilidade das soluções analíticas

A avaliação da estabilidade das soluções foi verificada a nível de solução estoque em armazenamento a 4°C, solução estoque em bancada a 20°C e solução analítica a 20°C, considerando períodos adequados a uma rotina normal de laboratório de qualidade. Para a avaliação da solução estoque em armazenamento a 4°C, uma solução estoque foi preparada e identificada como FRAÇÃO A. Essa fração teve parte diluída até concentração analítica e foi imediatamente analisada, considerando-se esse resultado como o inicial (REFERÊNCIA A). O restante da FRAÇÃO A foi imediatamente armazenada em geladeira a 4°C, sendo analisado após períodos de 7, 14 e 30 dias. Após cada período de dias a FRAÇÃO A foi retirada da geladeira, acondicionada termicamente, parte diluída à concentração de 0,02 mg mL⁻¹ para análise e o restante armazenado até o próximo período de avaliação.

A solução estoque também foi avaliada quanto a estabilidade a 20°C por um período de 6 horas, simulando a estabilidade de bancada. Para essa avaliação outra solução estoque foi preparada e identificada como FRAÇÃO B. Essa fração teve parte diluída até concentração analítica e foi imediatamente analisada, considerando-se esse resultado como o inicial (REFERÊNCIA B). O restante da FRAÇÃO B foi mantida em bancada a 20°C por 6 horas e somente então diluída a nível analítico e analisada. Para a verificação da estabilidade da solução analítica, a amostra estipulada como de REFERÊNCIA B foi mantida em bancada a 20°C por 12 horas e reanalisada. A estabilidade foi avaliada através de ferramentas estatísticas de teste *F* e teste *t* para comparação dos resultados obtidos na avaliação da estabilidade com amostra de referência.

4.6.5 Validação do método analítico por CLAE-DAD

A validação foi realizada de acordo com os critérios internacionais (ICH, 2005) e nacionais (ANVISA, 2017), estabelecidos na RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA). Os parâmetros de validação realizados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

O parâmetro seletividade foi avaliado através da comparação dos cromatogramas de amostras contendo possíveis substâncias interferentes

(excipientes utilizados na composição dos nanossistemas), amostras contendo produtos de degradação e diluente. A habilidade do método em discriminar o analito, mesmo na presença de outros componentes da matriz, foi avaliada pela inspeção visual de que no mesmo tempo de retenção do POH não há co-eluição de nenhum outro componente. A pureza de pico para o álcool perfílico foi avaliada com auxílio de detector DAD. Adicionalmente, a avaliação do efeito matriz foi verificada demonstrando-se o paralelismo entre as curvas analíticas obtidas com a solução padrão em diluente e solução amostra adicionada de padrão.

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração independentes, contemplando sete níveis de concentração igualmente distribuídos na faixa de 0,02 a 0,08 mg mL⁻¹. A linearidade foi determinada com base na regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da correlação entre resposta obtida no ensaio e a concentração analítica. O resultado da curva de calibração foi avaliado verificando-se a linearidade dentro do intervalo especificado, considerando a avaliação do gráfico de dispersão, determinação dos coeficientes linear e angular por método de regressão dos mínimos quadrados, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2), verificação da igualdade de variâncias e homocedasticidade, análise de variância, significância do coeficiente angular e análise de resíduos.

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Para a determinação da repetibilidade, foram realizadas nove análises de determinação contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A precisão intermediária, assim como a repetibilidade foi determinada por nove análises de determinação em três diferentes concentrações, porém executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento em um intervalo de tempo de 2 dias. A repetibilidade foi avaliada verificando-se valores de desvio padrão e desvio padrão relativo entre as amostras, para cada nível de concentração. A precisão intermediária foi avaliada verificando-se valores de desvio padrão, desvio padrão relativo, além da homogeneidade das variâncias e médias.

A exatidão foi determinada através do método de adição do padrão à amostra. Sendo verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada. Para isso uma amostra foi preparada a 30% da

concentração e a ela foram adicionadas quantidades suficientes de padrões para obter-se concentrações teóricas de 40%, 100% e 160%. O resultado foi avaliado como porcentagem da concentração recuperada do analito, quando comparada com a concentração teórica e desvio padrão relativo entre amostras de mesma concentração.

O intervalo especificado foi definido entre os limites de quantificação superior e inferior derivado do estudo de linearidade. Sua confirmação foi baseada nos resultados de exatidão, precisão e linearidade.

Na robustez, as variações nas condições experimentais e ambientais do procedimento analítico foram baseadas considerando apenas variações em parâmetros passíveis de ocorrência e dentro de intervalos coerentes considerando equipamento, ambiente e método. Dessa forma avaliaram-se 2 diferentes lotes de coluna cromatográfica, variação de temperatura do forno de coluna na faixa de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, variação no fluxo de fase móvel na faixa de $\pm 2\%$ e variação na concentração de solvente orgânico na fase móvel na faixa de $\pm 2\%$. O resultado foi avaliado como porcentagem da concentração recuperada do analito, quando comparada com a concentração teórica e desvio padrão relativo. No caso das impurezas de degradação, a avaliação foi realizada através da verificação do parâmetro cromatográfico resolução.

4.7 Tensiometria e estudos das propriedades interfaciais

As análises de tensão interfacial foram realizadas em um tensiômetro OCA15⁺ a uma temperatura ambiente de 25°C . O método utilizado foi o da gota pendente, no qual uma gota da solução de polímero, ou fármaco, é formada na ponta de uma agulha e permanece pendente dentro de um meio aquoso, contendo ou não os surfactantes. Após equilíbrio entre as forças de capilaridade e gravidade, o formato da gota foi captado por uma câmera e a tensão interfacial determinada pela sua curvatura através da equação de Laplace-Young (BHATTACHARYA; RAY, 2004; DEMARQUETTE; KAMAL, 1997; FREIRE et al., 2006).

Gotas de CHCl_3 puro, PLA-*b*-PEG dissolvido em CHCl_3 (20 mg mL^{-1}), POH dissolvido em CHCl_3 (20 mg mL^{-1}) e PLA-*b*-PEG + POH dissolvido em CHCl_3 (ambos a 20 mg mL^{-1}) foram formadas com auxílio de uma seringa de

vidro acoplada a uma agulha de aço inox SNS 052/026, dentro de uma cubeta de vidro contendo uma solução aquosa, contendo ou não diferentes surfactantes. As soluções de diferentes surfactantes (álcool polivinílico – PVAI; colato de sódio – SC) foram testadas em diversas concentrações, na faixa de 0,000001 até 1.5% (p/v).

Todas as medidas foram realizadas em sextuplicata, sendo o experimento realizado em diferentes dias para garantir a reprodutibilidade nas medições. Antes e depois de cada leitura, a cubeta de vidro foi lavada com acetona, seguida de duplo enxague com água ultrapurificada. Seringa e agulha foram lavadas apenas com acetona. Tanto solventes de limpeza, como as soluções avaliadas foram previamente filtradas em membranas de PTFE ou PVDF de 0,22 μm de poro para garantir a completa retirada de partículas sólidas. Anteriormente ao início de cada experimento, a tensão interfacial entre gotas de CHCl_3 em água destilada foram mensuradas como forma de verificação da qualidade de filtração e ajustes do equipamento, se mostrando estáveis e próximas de 29,6 mN m^{-1} (SU et al., 2015; YUAN et al., 2010). O excesso superficial máximo na interface (Γ_{max}), em mol m^{-2} , foi calculado através da isoterma de adsorção de Gibbs conforme a Equação 5. A área mínima ocupada por uma molécula de surfactante (a_{min}), em nm^2 de acordo com Equação 6, e a pressão superficial na interface entre fase aquosa e clorofórmio foi estimada usando a Equação 7 (BERG, 2010).

EQUAÇÃO 5 - CÁLCULO DO EXCESSO SUPERFICIAL MÁXIMO NA INTERFACE

$$\Gamma_{max} = \frac{-1}{2.303RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \log C} \right)_T$$

NOTA: R é a constante universal dos gases, T a temperatura, γ é a tensão interfacial/superficial e C a concentração de surfactante.

EQUAÇÃO 6 - ÁREA MÍNIMA OCUPADA POR UMA MOLÉCULA DE SURFACTANTE

$$a_{min} = \frac{10^{18}}{N_A \Gamma_{max}}$$

NOTA: N_A é o número de Avogadro.

EQUAÇÃO 7 - PRESSÃO SUPERFICIAL NA INTERFACE

$$\pi_{CMC} = \gamma_{solvente} - \gamma_{CMC}$$

NOTA: π_{CMC} é a pressão superficial, $\gamma_{solvente}$ é a tensão superficial do solvente, e γ_{CMC} é a tensão superficial quando na concentração micelar crítica (CMC).

4.8 Preparação das micropartículas contendo POH

Micropartículas contendo o POH foram preparadas pelo método de emulsificação simples (O/A) seguida de evaporação do solvente (PISANI et al., 2008), visto ser um procedimento similar à técnica pretendida para obtenção de nanopartículas. Previamente ao preparo das micropartículas, todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com solução de extran neutro, enxaguadas com água purificada e secas em estufa. Na sequência, foram enxaguadas com clorofórmio e secas em fluxo laminar para evitar a deposição de material particulado.

Para cada lote preparado, 10 mg de copolímero PLA-*b*-PEG, exatamente pesados, foram transferidos para frasco transparente de 10 mL com tampa rosqueável (50 mm x 22 mm, *altura x diâmetro*). A massa de copolímero foi solubilizada em 0,5 mL de clorofórmio, previamente filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm de tamanho de poro, constituindo a fase orgânica. O frasco foi tampado e mantido sob agitação magnética a 300 rpm por 5 min (agitador magnético *MAG15*), utilizando barra magnética (3 mm x 10 mm, *diâmetro x comprimento*). Posteriormente, 10 mg de POH foram transferidos volumetricamente, corrigindo-se a pureza e densidade ($d = 0,96 \text{ g mL}^{-1}$ a 25°C, 96% pureza). O frasco foi imediatamente tampado e mantido sob agitação magnética por mais 5 min a 300 rpm. Após, 2 mL de uma solução aquosa contendo surfactante (PVAI ou SC), recém preparada e filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro, foi adicionado sobre a solução orgânica e imediatamente emulsificada utilizando-se vórtex por 1 minuto a 2500 rpm (vórtex digital *Genie 2*).

Imediatamente após a emulsificação, o frasco contendo o emulsionado foi mantido aberto e sob agitação magnética a 300 rpm por 5 horas em capela de exaustão para completa evaporação do solvente e formação das microcápsulas contendo o POH. Para os estudos de microscopia de varredura a laser confocal

(CLSM), 10 μL de vermelho do Nilo ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em clorofórmio) foi adicionado à solução orgânica após completa solubilização do copolímero.

4.9 Eficiência de encapsulação das microcápsulas contendo POH

A EE (%) das microcápsulas foi realizada tanto de forma direta como indireta através da técnica de CLAE-DAD, conforme método analítico desenvolvido no item 4.6 (página 73). Para a determinação indireta da EE (%), o sobrenadante oriundo do processo de preparo das microcápsulas foi obtido pela da centrifugação ($1,440 \times g$, 30 min, 4°C) e separação por vertição. Após, o sobrenadante foi diluído em fase móvel para um volume final de 10 mL e mantido em banho ultrassônico por 5 minutos. Essa solução foi então diluída para concentração analítica (faixa de $0,02$ a $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$) utilizando-se fase móvel como diluente. Antes da injeção no equipamento, todas as amostras foram filtradas em membrana de PVDF de $0,22 \mu\text{m}$ de tamanho de poro. A EE (%) e LC (%) foram calculadas de acordo com a Equação 4 e Equação 3, respectivamente.

A determinação direta da EE (%) foi obtida com as microcápsulas separadas pelo processo de centrifugação acima descrito. As microcápsulas recuperadas foram diluídas em 2 mL de acetonitrila e mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos para completa dissolução do copolímero. Após, a solução foi diluída para concentração analítica utilizando-se fase móvel como solvente e posteriormente filtradas em membrana de PVDF de $0,22 \mu\text{m}$ de tamanho de poro antes da injeção. A EE (%) foi calculada de acordo com a Equação 2.

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas de lotes de micropartículas.

4.9.1 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação das microcápsulas foi avaliado em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, com pH ajustado em 7,4 e a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sob agitação continua a 100 rpm. O estudo de liberação foi realizada de acordo com as condições *sink* e em triplicata de lotes, utilizando a técnica de membrana de

diálise (BWATANGLANG et al., 2016; EL-HAMMADI et al., 2017). Cada lote de microcápsulas (cerca de 17 mg), carregados com cerca de 7 mg de POH, foram suspensos em 2 mL de tampão PBS e transferidos para membrana de diálise de celulose (MWCO, 12 KDa). As extremidades dos sacos de diálise foram fechadas com auxílio de fitas e submergidas em reservatórios contendo 60 mL de tampão PBS. Um volume de 1 mL do meio de dissolução foi coletado em diferentes intervalos de tempo (0,08; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,50; 2; 3; 4; 5; 6; 9 e 12 horas). Após cada coleta, quantidade equivalente de meio de dissolução foi repostada a fim de manter o volume final constante. A quantidade do POH dissolvida nas frações coletadas foram determinadas por CLAE-DAD de acordo com o método desenvolvido no item 4.6 (página 73). O preparo de amostra para as frações de meio coletadas foi realizado diluindo-se 300 µL de amostra para volume final de 1 mL com fase móvel, seguida de agitação com vortex por 1 minuto e filtração por membrana de PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro antes da injeção. O perfil de liberação foi obtido pela correlação da porcentagem de POH observada nas amostras em função do tempo de coleta. Para fins de correção da taxa de difusão, o mesmo experimento foi realizado com o POH não encapsulado.

4.9.2 Análises por Microscopia de varredura a laser confocal (CLSM)

Para as análises de CLSM, uma suspensão de micropartículas em glicerol foi preparada misturando-se 5 µL de microcápsulas, obtidas conforme item 4.8 (página 80) com igual volume de glicerol. Após, a suspensão foi transferida para lâmina de vidro sendo a lamínula selada com esmalte. A fim de contribuir para a redução do movimento browniano das partículas em suspensão, as lâminas preparadas foram mantidas por 1 hora em repouso absoluto, em posição invertida. Imagens foram obtidas com uma objetiva de 60x, com abertura numérica de 1.40 em óleo de imersão. Imagens fluorescente foram obtidas pela excitação do vermelho do Nilo usando laser a 561 nm e emissão a 595/50 nm (570 – 620 nm). Imagens das secções (eixo Z) foram coletadas com intervalos de 0,5 µm. Todas as imagens foram obtidas com o *software* Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) e as medidas processadas e analisadas usando o *software* ImageJ v1.51n. Triplicatas de lotes foram utilizadas para as

mensurações, todas realizadas no plano equatorial de cada microcápsula para minimizar erros de medida.

4.9.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A influência da microencapsulação na toxicidade do POH foi avaliada utilizando-se o ensaio de MTT com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (HEO et al., 1990). Para tanto, uma linhagem não tumoral de fibroblastos embrionários de rim (HEK-293) foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alta glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de antibiótico estreptomicina. Células HEK-293 foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço (volume de 100 μL), em microplacas de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO_2 , por 24 horas para adequada adesão celular. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes de POH puro e micropartículas contendo POH (intervalo de concentração de POH de 0,0025 a 2,5 mg mL^{-1}), assim como, quantidades equivalentes de microcápsulas isentas de POH. O volume final de meio de cultura em cada poço foi de 200 μL , sendo as células cultivadas por 24 e 72 horas. Para o experimento de 72 horas de tratamento, as células foram inicialmente semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço. Após o intervalo de tratamento (24 ou 72 horas), 20 μL de solução de MTT (5 mg mL^{-1} em tampão PBS) foi adicionada em cada poço e incubada por mais 4 h a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, para permitir a formação dos cristais de formazan (coloração azul escuro) pelas células metabolicamente ativas. Após, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 μL de mistura de DMSO:Etanol (1:1, v/v) em cada poço. As microplacas foram suavemente agitadas por 10 min. Os controles negativos (100% de células viáveis) foram plaqueadas apenas com meio de cultura e como controle positivo as células foram plaqueadas com meio de cultura contendo triton X a 0,1%.

A absorbância foi medida em um espectrofotômetro com leitor de microplacas a 570 nm. Todos os dados foram plotados como percentagem de células viáveis comparadas às células não tratadas (100%). Estudos prévios

mostraram que na ausência de células, tanto os surfactantes, como o copolímero e POH não influenciam na redução do MTT a cristais de formazan.

4.10 Obtenção de nanopartículas contendo álcool perílico

O método de preparo utilizado foi a emulsificação simples (O/A) seguida da evaporação do solvente orgânico, devido à lipofilicidade do álcool perílico. Previamente ao preparo das nanopartículas, todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com solução de extran neutro, enxaguadas com água purificada e secas em estufa. Na sequência, foram enxaguadas com clorofórmio e secas em estufa.

Para o preparo das nanocápsulas com o copolímero PLA-*b*-PEG, 25 mg (exatamente pesados) de copolímero foram previamente solubilizados em 0,5 mL de clorofórmio, previamente filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm de tamanho de poro, constituindo a fase orgânica. Após pesagem e solubilização do copolímero, o frasco foi tampado e mantido sob agitação magnética a 300 rpm por 5 min (agitador magnético *MAG15*), utilizando barra magnética (3 mm x 10 mm, *diâmetro x comprimento*). Posteriormente, 10 mg de POH foram transferidos volumetricamente, corrigindo-se a pureza e densidade ($d = 0,96 \text{ g mL}^{-1}$ a 25°C, 96% pureza). O frasco foi imediatamente tampado e mantido sob agitação magnética por mais 5 min a 300 rpm. Após, 2 mL de uma solução aquosa contendo surfactante (PVAI ou SC), recém preparada e filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro, foram adicionados sobre a solução orgânica e imediatamente emulsificada utilizando-se vórtex por 1 minuto a 2500 rpm (vórtex digital *Genie 2*). Imediatamente após a pré-emulsificação, a solução foi submetida a um disruptor ultrassônico (Sonics Vibra-Cell VCX 750) com ponta de titânio imersa no meio emulsionado, sob banho de gelo, para formação de nano gotículas (ciclo de 1 min, 20 KHz a 20% de amplitude).

Imediatamente após a nanoemulsificação, o frasco foi mantido aberto e sob agitação magnética a 300 rpm por 12 horas em capela de exaustão para completa evaporação do solvente e formação das nanocápsulas. As nanocápsulas foram recolhidas por ultracentrifugação ($14.857 \times g$, 30 min, 4°C) e lavadas duas vezes com água destilada para completa remoção do surfactante. A lavagem consistiu na ressuspensão, seguida de centrifugação e separação dos sobrenadantes para posterior análise. Após separação, as

amostras foram mantidas sob refrigeração. O preparo das nanocápsulas isentas de álcool perfílico foi realizado conforme metodologia acima descrita, porém sem a adição do POH na formulação.

4.11 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (IP) foi estimado por espalhamento de luz dinâmico (DLS), através da determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas, em equipamento NanoDLS com laser de 632,8 nm como fonte de radiação e detecção do sinal com ângulo de leitura de 90°. Para a preparação das amostras para leitura, as nanocápsulas obtidas após a purificação por centrifugação e diluídas na proporção de 1:40 (v/v) em água purificada e analisadas antes e após filtração em filtro de membrana éster de celulose com 0,45 µm. O tamanho médio foi calculado através da média aritmética.

O potencial zeta das partículas foi determinado pelo método de potencial de fluxo, em um equipamento Stabino®. Após purificação das nanocápsulas por centrifugação, as amostras foram diluídas em solução de NaCl a 10 mmol L⁻¹, na proporção de 1:25 (v/v) e analisadas a 25°C. As medidas do potencial zeta foram monitoradas durante 300 segundos. O potencial médio foi calculado através da média aritmética.

A morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando microscópio eletrônico de varredura. Foram obtidas imagens da superfície das nanopartículas, formadas a partir dos elétrons secundários, com o microscópio operando em 15 KV. Para a preparação das amostras, as nanocápsulas obtidas após as etapas de centrifugação e purificação foram dispersas em 50 µL de água purificada e fixadas em porta amostra metálico (*Stub* de alumínio 12,7 mm x 8 mm) previamente cobertos com uma fita adesiva de cobre, dupla face e condutora de carbono. As partículas foram cobertas com uma fina camada de ouro em câmara de metalização BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater.

A morfologia das nanocápsulas também foram examinadas através de microscopia eletrônica de transmissão, pelo método de contraste negativo. Para tanto, primeiramente as nanocápsulas obtidas após as etapas de centrifugação

e purificação foram dispersas em água purificada na proporção de 1:200 (v/v). A partir dessa suspensão, 5 µL foram transferidos para uma grade comum de cobre (400 mesh), em posição diagonal (45°) e mantida a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar até a completa secagem. Após esta etapa, adicionou-se 5 µL de solução aquosa de acetato de uranila a 2 % (p/v) e pH 3,5, para fixação e contraste da amostra. Após 1 minuto o excesso foi retirado com auxílio de papel filtro e a amostra foi submetida à análise por MET.

A EE (%) das nanocápsulas foi realizada tanto de forma direta como indireta através da técnica de CLAE-DAD, conforme método analítico desenvolvido no item 4.6 (página 73). Para a determinação indireta, foi utilizado o sobrenadante oriundo do processo de purificação por centrifugação. O sobrenadante foi diluído em fase móvel para um volume final de 10 mL e mantido em banho ultrassônico por 5 minutos. Essa solução foi então diluída para concentração analítica (faixa de 0,02 a 0,08 mg mL⁻¹) utilizando-se fase móvel como diluente. Antes da injeção no equipamento, todas as amostras foram filtradas em membrana de PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro. A EE (%) e LC (%) foram calculadas de acordo com a Equação 4 e Equação 3, respectivamente. A determinação direta da EE (%) foi obtida com as nanocápsulas purificadas pelo processo de centrifugação acima descrito. As nanopartículas recuperadas foram diluídas em 2 mL de acetonitrila e mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos para completa dissolução do copolímero. Após, a solução foi diluída para concentração analítica utilizando-se fase móvel como solvente e posteriormente filtradas em membrana de PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro antes da injeção. A EE (%) foi calculada de acordo com a Equação 2. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas de lotes de micropartículas.

As suspensões de nanocápsulas pós purificação por centrifugação foram armazenadas sob refrigeração (4 – 8°C) durante o prazo de uma semana, em frascos do tipo Eppendorf e monitoradas quanto à capacidade de reter o POH.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização polimérica

As sínteses dos copolímeros diblocos PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato foram realizadas partindo-se, respectivamente, de um bloco de polietilenoglicol com uma das extremidades protegidas por um grupamento metil éter (OH-PEG-OCH₃, M_n 5.000 g mol⁻¹) e por um bloco de polietilenoglicol α -amino, ω -hidroxila com uma extremidade protegida por um grupamento amino (OH-PEG-NH₂, M_n 5.000 g mol⁻¹). Uma vez que apenas uma das extremidades de cada bloco possuem um grupo hidroxila terminal, os blocos poliméricos foram construídos a partir dessa extremidade, mantendo-se o tamanho da cadeia de PEG equivalente entre eles. No processo de polimerização por ROP utilizando Sn(Oct)₂ como catalizador, os grupos hidroxila terminais das cadeias de PEG desempenharam função de iniciadoras de reação (KOWALSKI, DUDA; PENCZEK, 2000). O emprego de copolímeros com cadeias PEGuiladas em sistemas de entrega de fármaco fundamenta-se na redução da opsonização provocada pelo PEG, proporcionada pela repulsão estérica das proteínas plasmáticas pela superfície hidrofílica promovida pelo PEG. Como consequência, há um aumento na meia vida plasmática de formulações administradas intravenosamente (NOBS et al., 2003). Além disso, o tamanho da cadeia de PEG equivalente a 5.000 g.mol⁻¹ foi considerado como tamanho alvo, uma vez que na literatura foi demonstrado que esse tamanho reduz eficientemente a adsorção de proteínas plasmáticas, quando comparado a tamanhos menores ou muito maiores (GREF et al., 2000). As razões escolhidas entre *DL*-lactídeo/iniciador foram de 138:1, esperando-se a formação de blocos de PLA com tamanhos alvo de 20.000 g mol⁻¹. Uma vez que cada molécula de lactídeo (144,126 g mol⁻¹) contribui com duas unidades monoméricas (77,063 g mol⁻¹) na cadeia polimérica de PLA, para a construção de um bloco com tamanho de 20.000 g mol⁻¹ é necessária a repetição de 278 unidades monoméricas.

Nas reações de polimerização, a mistura de reagentes permaneceu homogênea e transparente durante todo o transcorrer da reação. Com o prosseguimento da reação foram formados segmentos mais longos de PLA e a

mistura reacional tornou-se progressivamente mais viscosa. A reação foi realizada em um meio orgânico isento resíduos de água, pois a presença de impurezas próticas poderiam atuar como coiniciadores da reação diminuindo a eficiência do processo (DECHY-CABARET, MARTIN-VACA; BOURISSOU, 2004). O processo de purificação de PLA é usualmente feito através de dissolução/precipitação usando sistemas de agentes solventes e precipitantes (SCHWACH et al., 1997). Após evaporação do tolueno o produto foi solubilizado em clorofórmio e posteriormente precipitado em éter dietílico para remoção do catalizador e lactídeo não polimerizado (impurezas solúveis em éter dietílico). Posteriormente o resíduo da precipitação em éter dietílico foi dissolvido em acetona e precipitado em água para remoção do PEG não reagido (impurezas solúveis em água). O rendimento médio para o copolímero PLA-*b*-PEG, após perdas devido ao processo de purificação, foi próximo a 87%.

A conjugação do copolímero PLA-*b*-PEG-NH₂ com folato se iniciou com a ativação do grupamento carboxílico do folato com EDC e NHS formando uma ligação éster entre o NHS e folato, seguida da reação com o copolímero. Apesar da literatura relatar a possibilidade de conjugação do folato, tanto entre a grupamento γ -carboxílico (ESMAEILI et al., 2008; NIE et al., 2009; SINGH et al., 2015; YOO; PARK, 2004a; 2004b) como entre a amina primária do anel pteridínico (PHAN et al., 2016), optou-se por conjugar via grupamento γ -carboxílico, pois foi reportado na literatura que o anel pteridínico tem forte relação com o reconhecimento pelos receptores de folato (CHEN et al., 2013; LEE et al., 2001).

A realização da conjugação em um procedimento de duas etapas utilizando EDC e NHS foi escolhida por apresentar maior eficiência. O EDC reage com o grupamento ácido carboxílico do folato para formar um éster intermediário reativo (O-acilisouréia). No entanto, esse complexo reage de forma lenta com as aminas das moléculas alvo e, além disso, por ser extremamente lábil pode hidrolisar antes de completar toda a reação. O uso concomitante de NHS proporciona a formação de um outro intermediário reativo a partir do O-acilisouréia, um sulfo-NHS éster. Além de mais estável à hidrólise, esse intermediário reage mais rapidamente com grupamentos aminos aumentando consideravelmente o rendimento da reação. Na presença da amina primária do copolímero, o grupamento carbonila deficiente em elétrons são atacados pelas

aminas nucleofílicas, deslocando rapidamente grupamento sulfo-NHS e criando uma ligação amida estável com o polímero (HERMANSON, 2013). Após conjugação a solução de DMSO foi gotejada em água para remoção das impurezas hidrossolúveis (NHS, EDC, O-acilisouréia). Posteriormente o resíduo da precipitação em água foi congelado, liofilizado, dissolvido em diclorometano, e centrifugado para remoção do folato não reagido. Após gotejamento do sobrenadante em água e evaporação, o copolímero purificado foi obtido por liofilização. O rendimento médio, após perdas devido ao processo de purificação, foi próximo a 85% e 67 % para os copolímeros PLA-*b*-PEGNH₂ e PLA-*b*-PEG-Folato, respectivamente.

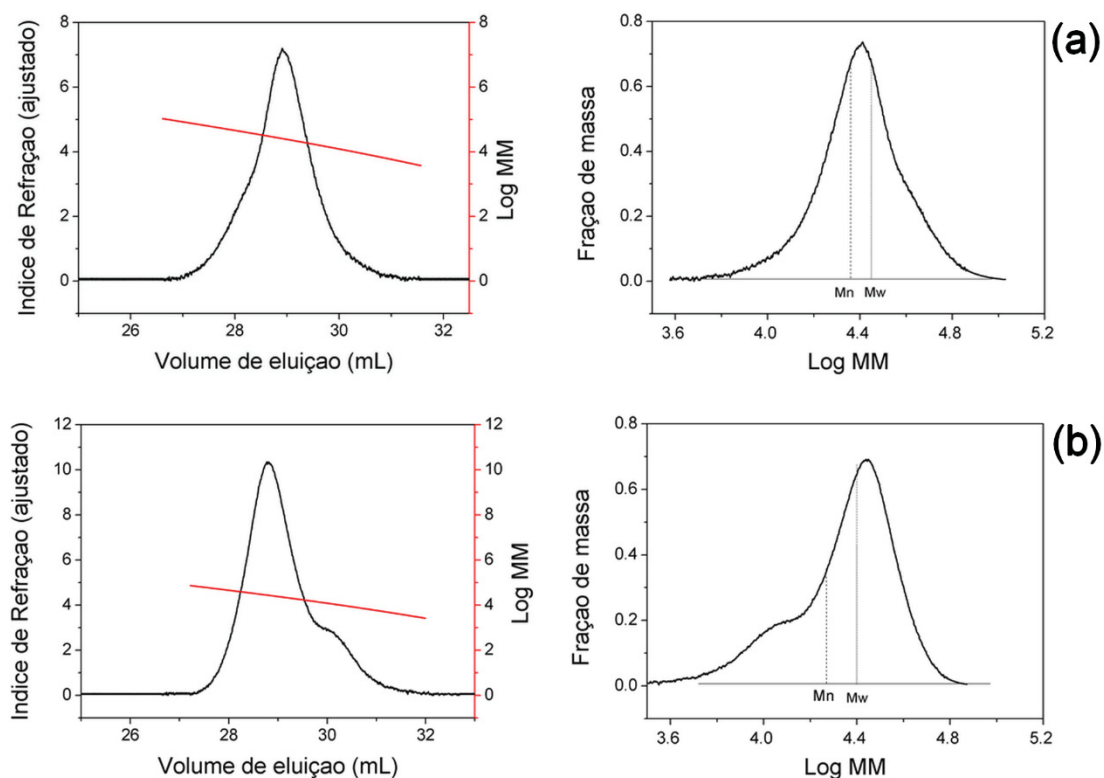
A partir da análise por GPC foram obtidos os resultados de massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e índice de polidispersão (IP) para cada copolímero sintetizado. Na Tabela 1 são apresentados os dados obtidos por GPC. Observa-se que os dados de tamanho de massa molar foram próximos ao valor teórico esperado, indicando que a razão entre monômero/iniciador utilizada foi adequada nas condições de temperatura e tempo estipuladas. Inclusive os resultados demonstraram certa reprodutibilidade, uma vez que mesmo com iniciadores diferentes os resultados foram semelhantes. O grau de polimerização numérico médio (DP_n) para os copolímeros foi obtido pela divisão de M_n pela massa molar do dímero repetitivo (144,126 g mol⁻¹). Em média, PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato apresentaram 158 e 130 unidades repetitivas em suas cadeias poliméricas. A distribuição molecular ficou entre 1,234 e 1,334, demonstrando que houve polimerização de forma quase homogênea entre monômeros e as cadeias de PEG. Os valores de IP próximos a 1 indicam que a etapa de síntese ocorreu de forma controlada e homogênea. Comparado com dados da literatura, os resultados de polidispersão foram coerentes, conforme observado no trabalho de HOUVENAGEL et al. (2017), para copolímeros estruturalmente semelhantes. Na Figura 13 são apresentados os dados obtidos pela análise de GPC.

TABELA 1 - DADOS DE RELAÇÕES MOLARES ENTRE MONÔMERO E INICIADOR UTILIZADOS NA POLIMERIZAÇÃO, MASSA MOLAR ESPERADA, MASSAS MOLARES E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) DOS COPOLÍMEROS SINTETIZADOS OBTIDOS POR MEIO DO GPC

Copolímero	Razão molar	Tamanho teórico	M_n (g mol ⁻¹)	M_w (g mol ⁻¹)	IP (M_w/M_n)
PLA- <i>b</i> -PEG	138	25.000	22.754	28.087	1,234
PLA- <i>b</i> -PEG-Folato	138	25.441	18.773	25.043	1,334

NOTA: M_n – massa molar numérica média; M_w – massa molar ponderal média.

FIGURA 13 - CROMATOGRAMAS DE CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC). (a) COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG, (b) COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG-FOLATO

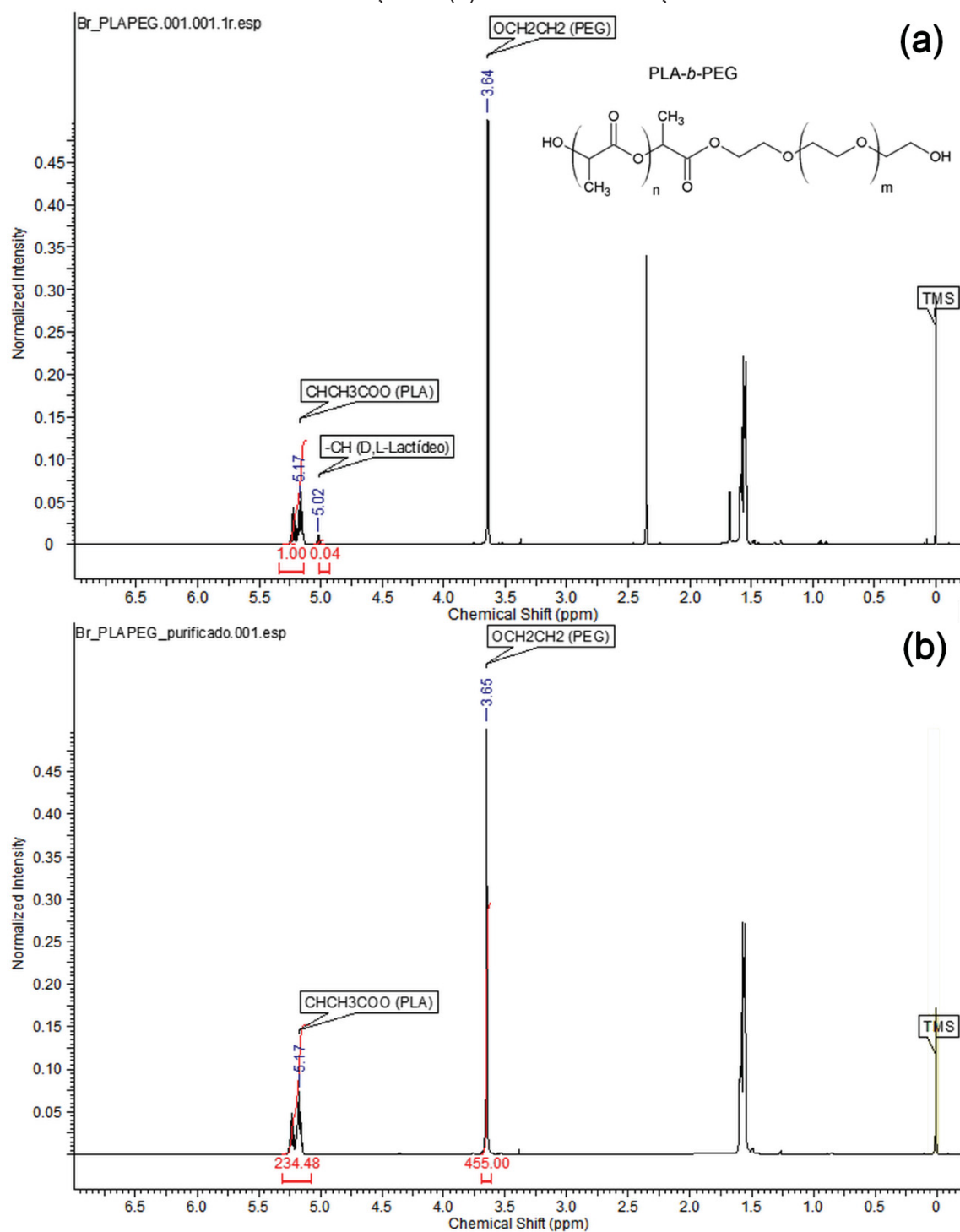


NOTA: À esquerda são apresentadas as distribuições de massa molar (mm) determinadas com base em uma curva de calibração construída com padrões de poliestireno. A reta vermelha representa a relação entre o logaritmo da massa molar e volume de eluição. À direita são apresentadas as massas molares numérica MÉDIA (M_n) e ponderal média (M_w), indicadas por retas tracejadas.

Análises dos espectros RMN de ¹H permitiram a caracterização da ligação entre os blocos PLA e PEG, a determinação quantitativa da massa molar de PLA e o percentual de conversão monomérica para ambos os copolímeros. Os resultados observados foram condizentes com o reportado na literatura (ALIBOLANDI et al., 2015; GOURDON et al., 2017; WANG et al., 2018; XU et al., 2016), demonstrando que as modificações propostas, como razão entre

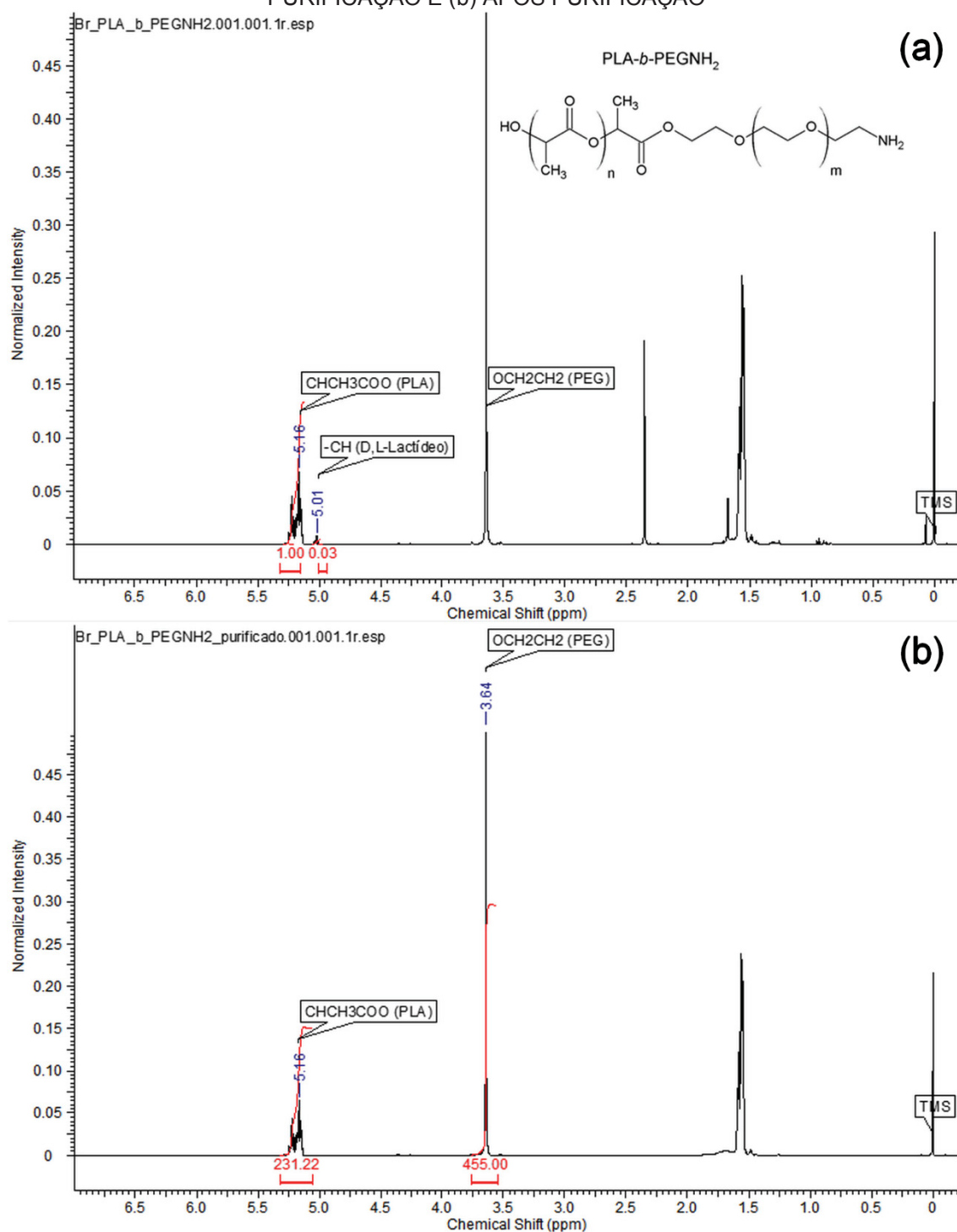
monômero e iniciador e condições reacionais, foram adequadas. Os espectros de NMR de ^1H (Figura 14 e Figura 15) revelam um singlete correspondente aos hidrogênios do grupo metileno terminal da cadeia de PEG (OCH_2CH_2 , $\delta = 3,64$ ppm) e um multiplete correspondente aos hidrogênios do grupo metino do PLA (CHCH_3COO , $\delta = 5,17$ ppm), confirmando a síntese do copolímero. Através da integração desses sinais a massa molar foi determinado em 21.900 e 21.600 g mol^{-1} (PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEGNH₂, respectivamente), valores muito próximos ao teórico, indicando a eficiência no processo de polimerização. Para o cálculo leva-se em consideração que o PEG utilizado (5.000 g mol^{-1}) possui 113,75 unidades do mero derivado do etileno glicol ($44,053 \text{ g mol}^{-1}$). Uma vez que cada unidade de etilenoglicol possui quatro hidrogênios metilênicos, o PEG utilizado apresentaria 455 hidrogênios metilênicos. Cada unidade monomérica no PLA ($72,063 \text{ g mol}^{-1}$) possui apenas um hidrogênio, uma vez que a integração foi de 234,48 (PLA-*b*-PEG) (Figura 14b), a massa molar pôde ser determinada multiplicando-se a integração obtida para o sinal em 5,17 ppm por $72,063 \text{ g mol}^{-1}$, com posterior adição da massa do bloco de PEG. Para o PLA-*b*-PEGNH₂, a integração foi de 231,22 (Figura 15b). Além disso, os dados de tamanho são muito próximos aos obtidos para o valor de M_n pela técnica de GPC. O grau de conversão monomérica foi de 96,2% e 97,1% para os copolímeros PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEGNH₂, respectivamente. Uma vez que o total de hidrogênios integrados representam 100%, os valores equivalem ao percentual de conversão e não conversão.

FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG (a) ANTES DA PURIFICAÇÃO E (b) APÓS PURIFICAÇÃO



NOTA: 400.13 MHz, CDCl₃, 30°C.

FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO COPOLÍMERO PLA-*b*-PEGNH₂ (a) ANTES DA PURIFICAÇÃO E (b) APÓS PURIFICAÇÃO

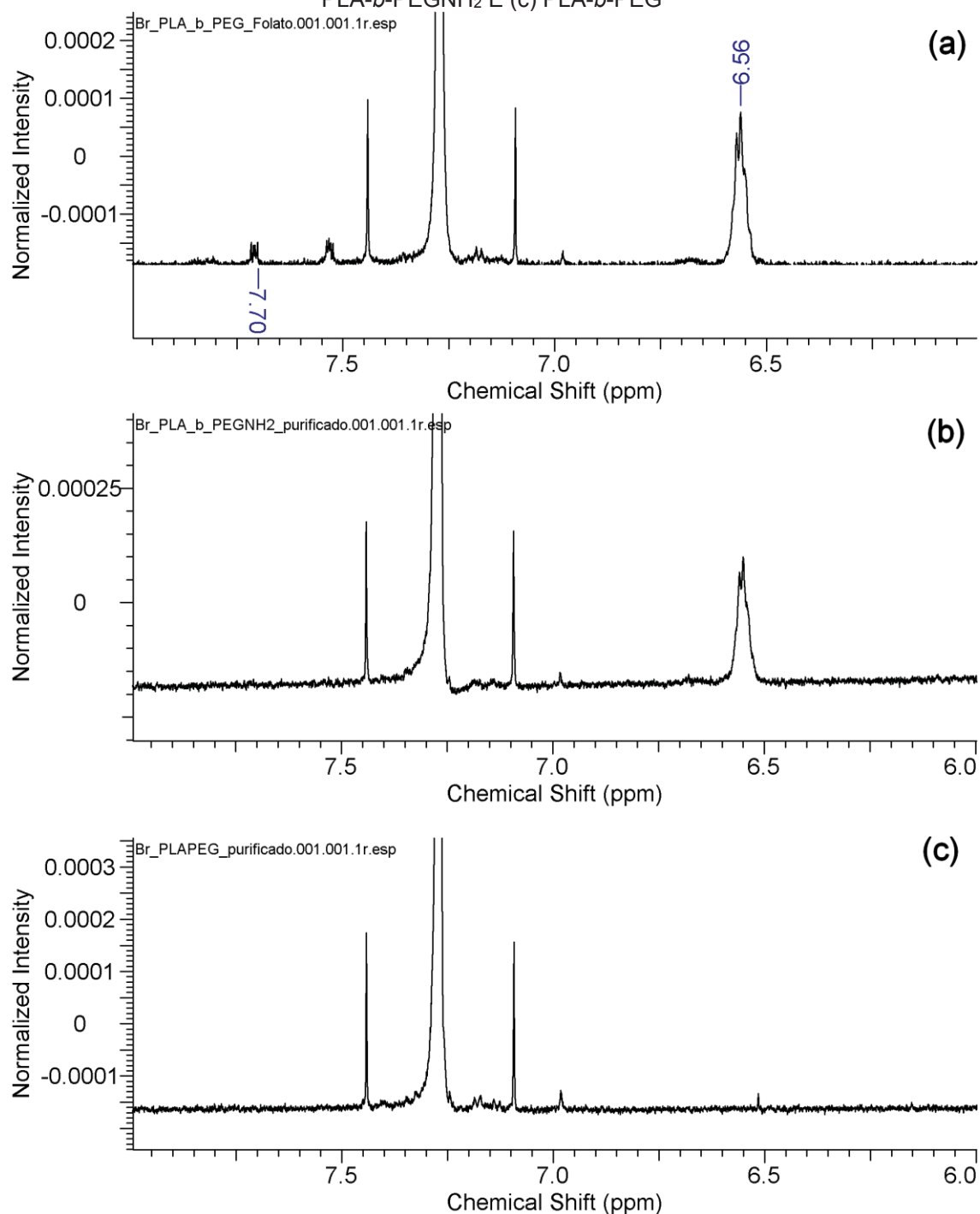


NOTA: 400.13 MHz, CDCl₃, 30°C.

De acordo com o trabalho publicado por GOURDON et al. (2017), os espectros RMN de ^1H para copolímeros de PLA-*b*-PEG com a presença de uma amina terminal ($-\text{NH}_2$) no bloco de PEG apresentam um sinal pouco intenso e característico em 7,7 ppm. Quando acoplada a um ligante, o pico de integração

diminui em um próton (-NH-) e aparece em 6,6 ppm. Por outro lado, ZHAO et al. (2011) destacaram que a presença do grupamento folato no PLA-*b*-PEG-Folato pode ser confirmada através de sinais pouco intensos característicos do anel benzênico do folato ($\delta = 6,6$ ppm dos prótons dos carbonos 3',5'; $\delta = 7,6$ ppm dos prótons dos carbonos 2',6'). Pela análise da figura 16, pode-se observar que na região entre 8 e 6 ppm, há diferenças observáveis entre os espectros de RMN de ^1H do PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEGNH₂ e PLA-*b*-PEG-Folato. O mais evidente é ausência do sinal em 6,56 ppm para o copolímero PLA-*b*-PEG (Figura 16c). De acordo com GOURDON et al. (2017) deveria ser esperado um sinal em 7.7 ppm referente à amina terminal (-NH₂), porém tal sinal não foi observado (Figura 16b), por outro lado, o sinal observado em 7.7 ppm, apenas para o PLA-*b*-PEG-Folato (Figura 16a), pode ser um indício dos hidrogênios do anel benzênico ($\delta = 7,7$ ppm dos hidrogênios dos carbonos 2',6'). A partir dos dados obtidos nas condições especificadas da análise por RMN de ^1H , sinais característicos do grupamento folato não puderam ser diferenciados de forma segura. Além disso, uma vez que os sinais relatados para o grupamento benzênico do folato apresentaram deslocamentos similares, a diferenciação tornou-se difícil. Uma vez que cada molécula copolimérica (20.000 g mol⁻¹) possui apenas um grupamento amino terminal (PLA-*b*-PEGNH₂) e/ou um grupamento folato (PLA-*b*-PEG-Folato), as condições em que as amostras foram analisadas não favoreceram o aparecimento dos sinais característicos e suas diferenciações.

FIGURA 16 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO COPOLÍMERO (a) PLA-*b*-PEG-FOLATO, (b) PLA-*b*-PEGNH₂ E (c) PLA-*b*-PEG

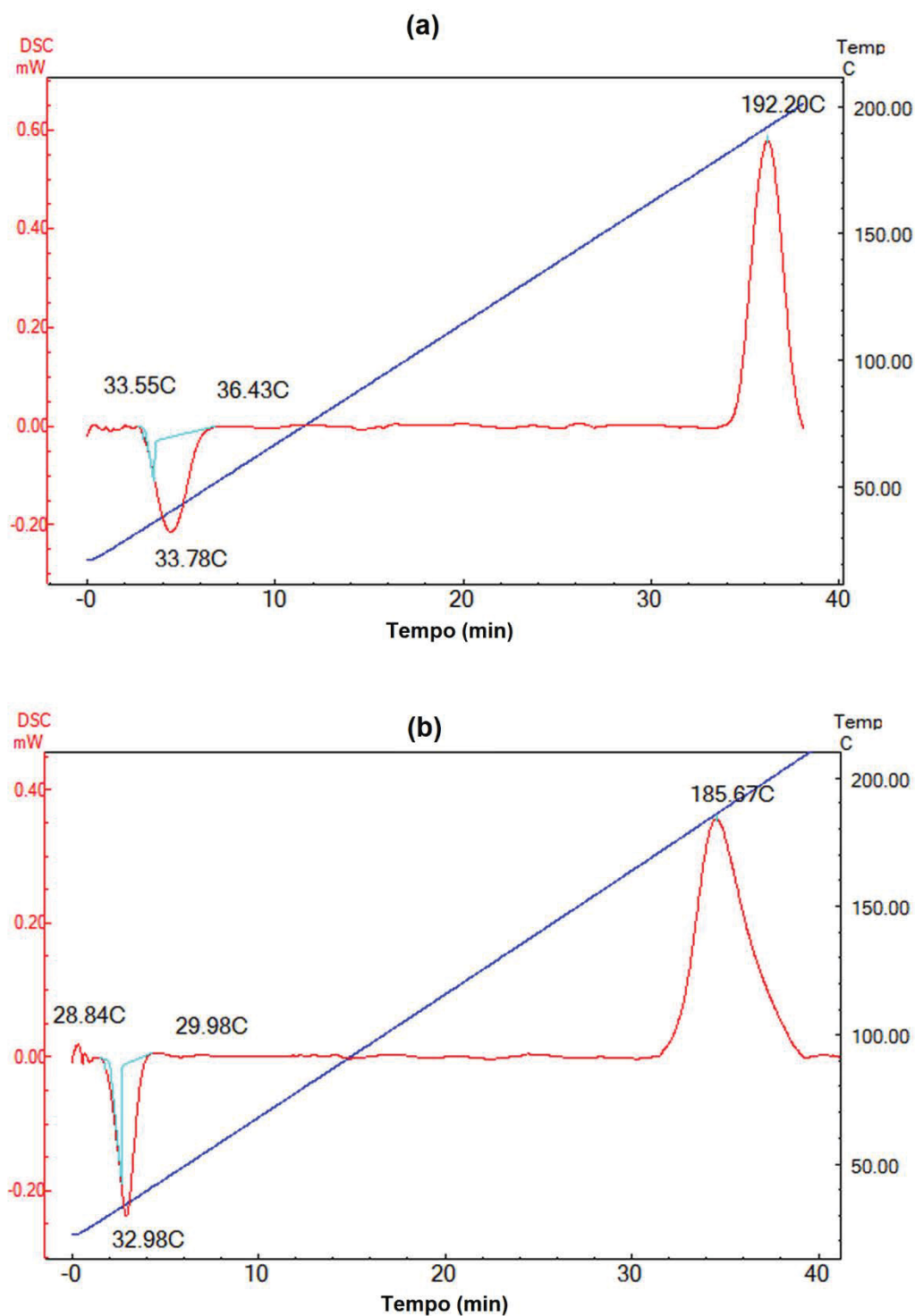


NOTA: 400,13 MHz, CDCl_3 , 30°C. Aumento de escala (eixo X - deslocamento químico) para região compreendida entre 8 e 6 ppm.

Na Figura 17 são mostradas as curvas obtidas de DSC para os copolímeros produzidos. Pôde-se visualizar claramente a presença dos eventos relacionados à transição vítrea (T_g) para todas as amostras, indicando que o material é amorfo. Para o copolímero PLA-*b*-PEG (Figura 17a) a T_g foi

aproximadamente 33,78°C, enquanto que para o copolímero conjugado ao folato a T_g foi de 32,98 °C (Figura 17b). Uma vez que a presença do folato não representa aumento significativo no tamanho molecular do copolímero, a pequena diferença observada entre as transições vítreas foi coerente. ALIBOLANDI et al. (2015) relatou temperaturas de transição vítreas aproximadas de 40° e 50°C para os seguintes copolímeros: PLA-*b*-PEG (9.000/5.000 g mol⁻¹) e PLA-*b*-PEG (15.000/5.000 g mol⁻¹), respectivamente. Além disso, a T_g dos copolímeros é afetada pelo tamanho molecular, mostrando uma relação diretamente proporcional entre aumento da T_g com tamanho da cadeia de PLA. Já WANG et al. (2018) determinou a T_g de copolímeros PLA-*b*-PEG(1.900)NH₂ e PLA-*b*-PEG(1.900)Folato com tamanhos de cadeia de PLA de 8.000, 28.000 e 40.000. De acordo com este autor as temperaturas de T_g também aumentaram com o tamanho molecular. De acordo com os resultados observados, pôde-se concluir que há coerência com o descrito na literatura.

FIGURA 17 - CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC). (a) PLA-*b*-PEG E (b) PLA-*b*-PEG-FOLATO

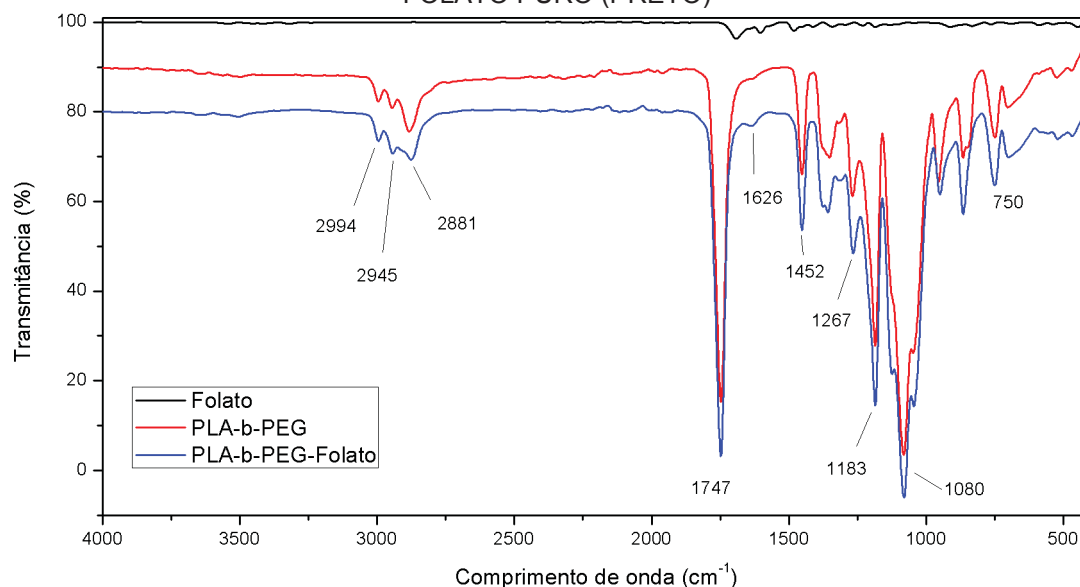


NOTA: Aproximadamente 3 mg de amostra, faixa de 20°C – 200°C, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, atmosfera de ar sintético.

Nas Figura 18 e Figura 19 são apresentados os espectros obtidos na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹). As aquisições para os

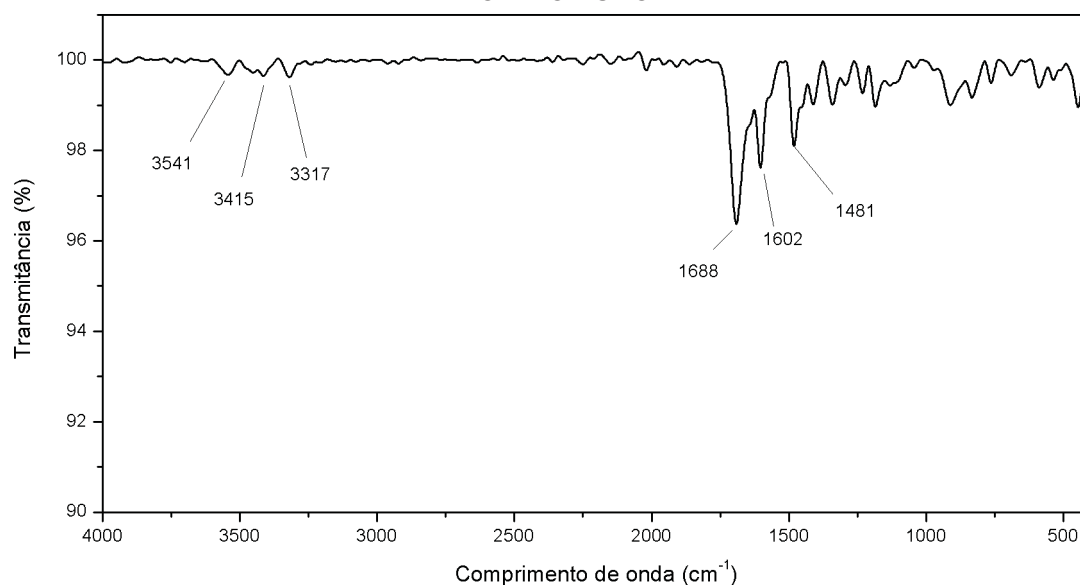
copolímeros foram realizadas na forma pura. Como forma de observar bandas com intensidade equivalentes, o folato puro foi diluído em brometo de potássio (KBr), previamente seco em estufa a 105°C por 2 horas, a fim de se obter uma concentração equimolar à observada no copolímero. Todos os copolímeros apresentaram bandas de absorção coerentes com o já descrito na literatura (BODDU et al., 2012; EL-GOGARY et al., 2014; HAMI et al., 2014; PHAN et al., 2016; XU et al., 2016). Pela análise dos espectros pôde-se identificar bandas em 2994 – 2945 cm^{-1} (estiramentos do C-H), uma banda forte em 1747 cm^{-1} (estiramento do C=O), banda em 1452 cm^{-1} (deformações angulares do C-H), banda em 1183 cm^{-1} (estiramento assimétrico do C-O), banda em 1080 cm^{-1} (estiramento assimétrico do C-O-C) e banda em 750 cm^{-1} (deformações angulares de CH). As principais bandas de absorção características do PLA são devidas às vibrações do grupo éster, banda aguda em 1759 cm^{-1} devido ao estiramento do C=O, banda em 1183 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico do C-O (Figura 18). As absorções características do PEG correspondem a uma banda intensa em 1.080 cm^{-1} devida ao estiramento assimétrico do C-O-C (Figura 18). As bandas de absorção características mais importantes do folato são em 3541 e 3415 cm^{-1} (estiramento N-H da amina primária e amida), banda em 3317 cm^{-1} (estiramentos C-H e C=C), banda em 1688 cm^{-1} (ligação aromática C=C), banda em 1481 cm^{-1} (CH-NH-C=O) (Figura 19). A conjugação do folato com o copolímero pôde ser caracterizada por uma ligação amida (-CONH-), com bandas pouco intensas em 1621 cm^{-1} e 1563 cm^{-1} . Apenas uma banda pouco intensa próxima a 1626 cm^{-1} (C=O) pode ser observada (Figura 19). Já a banda em 1563 cm^{-1} (N-H), não pôde ser seguramente diferenciada do ruído do espectro.

FIGURA 18 - ESPECTROS ADQUIRIDOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA O COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG (VERMELHO), COPOLÍMERO PLA-*b*-PEG-FOLATO (AZUL) E FOLATO PURO (PRETO)



NOTA: 4000 – 400 cm^{-1} , 24 varreduras, 4 cm^{-1} , 45 – 55% umidade, 25°C, módulo de aquisição ATR. Espectro dos copolímeros PLA-*b*-PEG (vermelho) e copolímero PLA-*b*-PEG-FOLATO (azul) com deslocamentos no eixo y de 10 e 20%, respectivamente. Folate diluído em KBr anidro para se obter concentração equimolar à observada no copolímero PLA-*b*-PEG-FOLATO.

FIGURA 19 – ESPECTRO ADQUIRIDO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA O FOLATO PURO

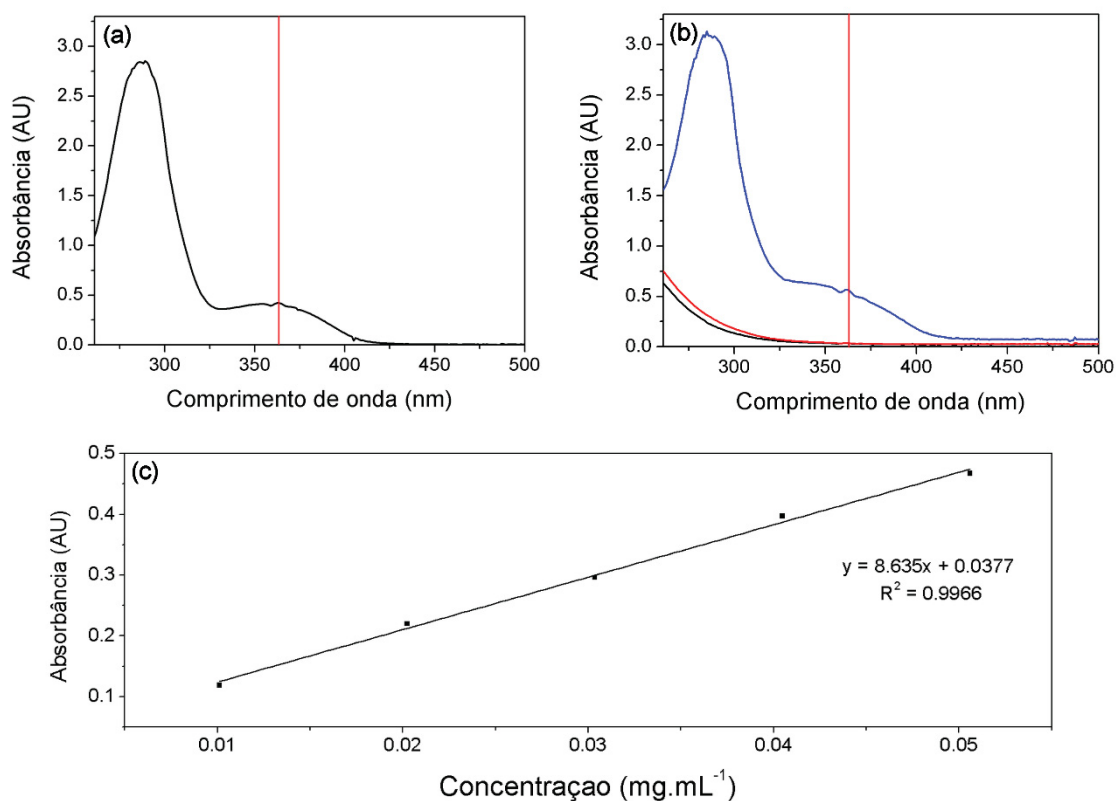


NOTA: 4000 – 400 cm^{-1} , 24 varreduras, 4 cm^{-1} , 45 – 55% umidade, 25°C, módulo de aquisição ATR.

O percentual de conjugação de folato no copolímero foi determinado através de espectrofotometria no UV-vis, baseado na metodologia proposta por YOO; PARK (2004a) e YOO; PARK (2004b). Inicialmente o espectro de absorção

do folato livre e dos copolímeros PLA-*b*-PEG, PLA-*b*-PEGNH₂ e PLA-*b*-PEG-Folato foram adquiridos na região de 260 a 500 nm (Figura 20a,b). O comprimento de onda de 363 nm, citado na literatura para doseamento do folato, foi considerado adequado uma vez que os copolímeros PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEGNH₂ não apresentaram absorção significativa nesse comprimento de onda (Figura 20b). A reação de conjugação entre folato e copolímero utilizou uma razão de 0,0575 mmol para 0,0288 mmol (razão estequiométrica de 2:1). Considerando a hipótese de etapa de conjugação 100% eficiente, seguida de adequada purificação do folato não reagido, estimou-se que cada 10 mg de copolímero possua 0,1732 mg de folato conjugado. Dessa forma, uma curva de calibração foi construída contemplando um intervalo de 0,01 até 0,05 mg mL⁻¹ de folato (r^2 0,997) (Figura 20c).

FIGURA 20 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA COM FOLATO. (a) FOLATO LIVRE, (b) PLA-*b*-PEG (COR PRETA); PLA-*b*-PEGNH₂, (COR VERMELHA) PLA-*b*-PEG-FOLATO (COR AZUL) E (c) CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA COM FOLATO



NOTA: Espectros de absorção obtidos na faixa ultravioleta de 260 – 500 nm, a 0,04 mg mL⁻¹ em DMSO, 25°C. Curva de calibração obtida com folato na faixa de concentração de 0,01 - 0,05 mg mL⁻¹.

O percentual de conjugação foi determinado em triplicata. A absorbância média foi de $0,3352 \pm 0,002$ AU. Pelo resultado obtido estimou-se que a eficiência de conjugação foi próxima à 33 %. Ou seja, para cada 10 cadeias de PLA-*b*-PEG-NH₂, 3 apresentam o folato ligado covalentemente. Os valores de conjugação obtidos são um pouco inferiores ao reportado na literatura. HU et al. (2012) obtiveram rendimento de 60% obtido para um copolímero similar, mas obtido por reação diferente. SINGH et al. (2015) obtiveram 53% para um polímero diferente, mas com reação mais parecida. No entanto, não se pode afirmar se os valores obtidos são baixos, uma vez que alguns autores não citam os valores obtidos (NIE et al., 2009; PHAN et al., 2016; WANG et al., 2012). Apesar do folato possuir dois grupamentos carboxílicos (α e γ) e ambos serem passíveis de conjugação utilizando EDC/NHS, é sabido que o ácido γ -carboxílico é primariamente conjugado devido à sua maior reatividade (SINGH et al., 2015; WANG et al., 1996; WANG et al., 1997; YOO; PARK, 2004b). Como na etapa de ativação do folato com EDC/NHS utilizou-se apenas um leve excesso dos reagentes, a conjugação com o ácido γ -carboxílico deve ocorrer de forma preferencial. Além disso, com base nos resultados acima discutidos, pôde-se inferir que funcionalização não ocorreu de forma significativa.

De forma geral, copolímeros anfifílicos PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-Folato foram obtidos pela polimerização por abertura de anel usando *DL*-lactídeo e Sn(Oct)₂ como catalizador. Como iniciadores foram usados polietilenoglicol metil éter com hidroxila terminal (M_n 5.000 g mol⁻¹) e polietileno glicol metil éter com amina primária terminal (M_n 5.000 g mol⁻¹), respectivamente. O tamanho molecular ficou em aproximadamente 18.000 a 22.000 g mol⁻¹ com índices de polidispersão próximos a 1,3. A formação dos copolímeros foi caracterizada quanto a estrutura química, apresentando resultados de acordo com o relatado na literatura e confirmando-se, inclusive, a conjugação com folato. Os copolímeros sintetizados se mostraram adequado para a utilização nas etapas seguintes do presente trabalho.

5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD

5.2.1 Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade

O desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD) se fez necessário, como forma de se obter uma ferramenta confiável e reproduzível para o processo de caracterização dos micro e nanossistemas produzidos nesse trabalho, para a determinação da eficiência de encapsulação (EE). Para essa finalidade, o uso de CLAE-DAD foi escolhido por se tratar de uma técnica mais seletiva se comparada à espectrofotometria no ultravioleta e menos onerosa se comparada a CLAE-EM/EM.

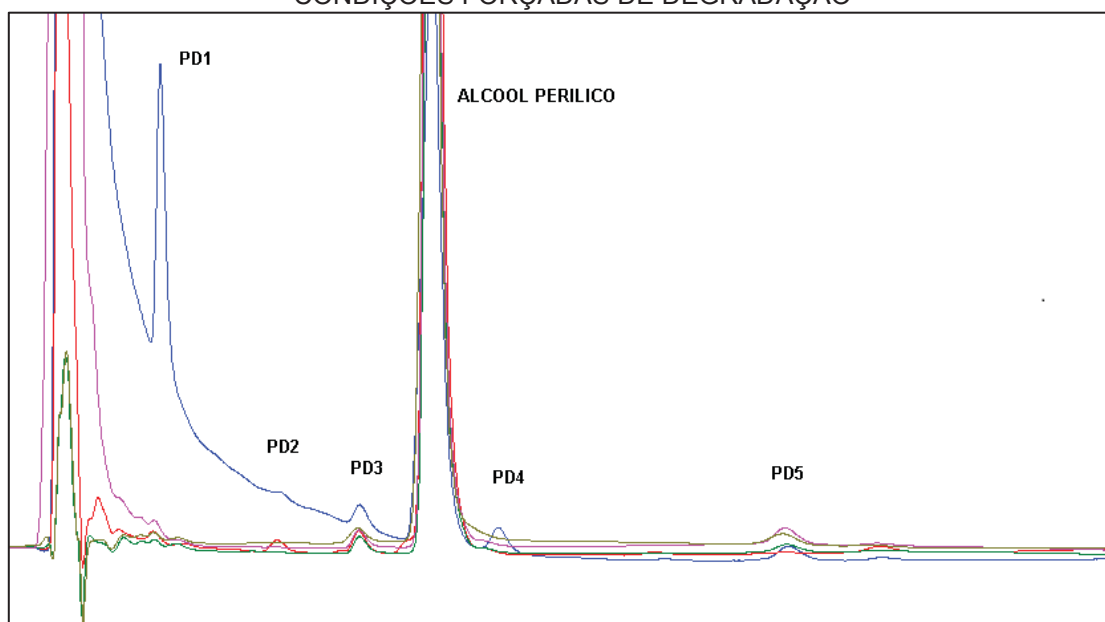
A obtenção dos micros e nanossistemas contendo POH foi realizado através de processos que envolveram condições não muito brandas, por exemplo, o uso de disruptor ultrassônico de alta energia para a emulsificação, o que gera calor durante o processo de obtenção. Somado a isso, como a avaliação da EE será realizada através do doseamento do ativo de forma indireta, optou-se por desenvolver um método indicativo de estabilidade, capaz de avaliar a possível presença de impurezas oriundas da degradação, sejam elas provenientes do processo de fabricação ou após armazenagem por longos períodos, para determinação do prazo de validade. Dessa forma, busca-se evitar equívocos na determinação da EE.

Um método indicativo de estabilidade pode ser definido como aquele capaz de detectar e/ou quantificar todos os produtos de degradação relevantes do perfil de degradação de um insumo farmacêutico ativo (IFA) ou medicamento. Porém, desenvolver tal método utilizando apenas amostras do IFA ou medicamento é inviável, devido às degradações não estarem presentes em condições normais. Dessa forma faz-se necessário causar deliberadamente a degradação do produto, expondo-o a condições extremas que possam contribuir para sua obtenção. Para atendimento da norma nacional vigente sobre estudos de perfil de produtos de degradação, as condições avaliadas nesse estudo foram: umidade elevada, meio ácido, meio básico, meio oxidativo, foto exposição e térmica seca.

Por não haver relatos na literatura sobre método indicativo de estabilidade e perfil de degradação para o POH, a fim de se obter degradações primárias, ou seja, os primeiros produtos oriundos da degradação, inicialmente optou-se por condições de estresse mais brandas. Utilizou-se condição ácida com HCl 0,1 mol L⁻¹, básica com NaOH 0,1 mol L⁻¹, oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3%, aquecimento a 40°C, umidade a temperatura ambiente e fotolítica (exposição 1,2 Milhões de lux hora e 200 w h m⁻²). No entanto, mesmo após um período de 10 dias de exposição não foram observadas a formação de produtos de degradação e/ou decaimento no teor do ativo. Diante dos resultados obtidos preliminarmente, decidiu-se por aumentar a intensidade das condições de estresse, passando para as seguintes condições: ácida com HCl 1 mol L⁻¹, básica com NaOH 1 mol L⁻¹, oxidativa com peróxido de hidrogênio a 15%, aquecimento a 60°C, umidade a temperatura de 60°C. Para a condição fotolítica, o álcool perílico foi considerado estável, visto que a condição utilizada já ser a máxima prevista em normas para estudos de estabilidade de formas farmacêuticas, tanto nacionais (ANVISA), como internacionais (ICH).

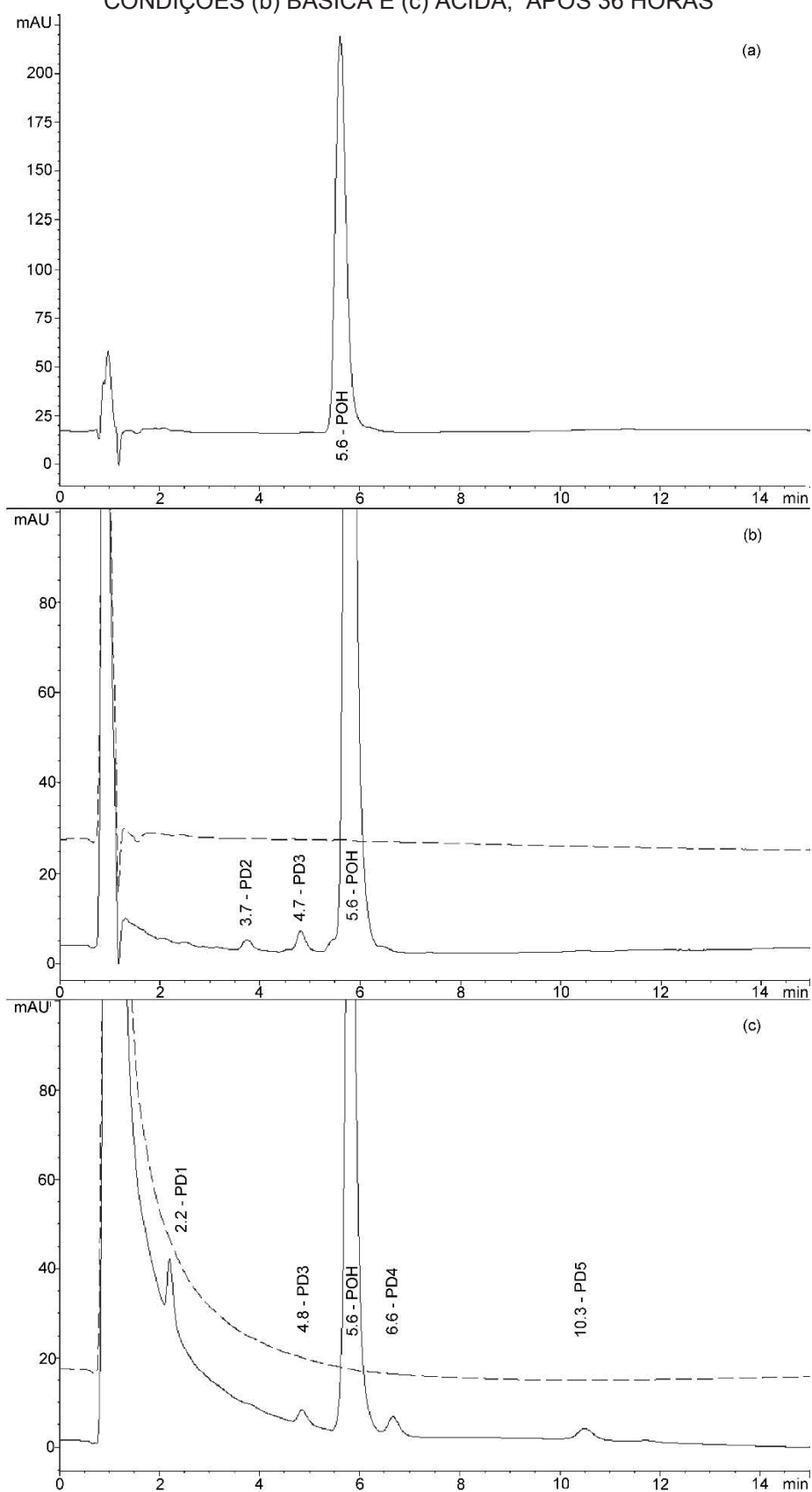
As amostras nas condições mais drásticas foram analisadas imediatamente após o preparo, não identificando nenhum produto de degradação. Após um período de exposição de 36 horas todas as amostras apresentaram diferentes perfis de degradação, aliado a um decaimento na área do POH entre 10% e 30%. O percentual de degradação foi considerado adequado, uma vez que decaimentos de área inferior a 10% podem ser oriundo de variação analítica e valores acima podem representar uma maior probabilidade de degradações secundárias. A condição ácida de degradação resultou em quatro produtos de degradação (PD1, PD3, PD4 e PD5). A condição básica resultou em dois produtos de degradação (PD2 e PD3). O produto de degradação identificado como PD3 também foi observado na condição oxidativa, térmica seca e umidade elevada. O PD5 também foi observado nas condições oxidativa e térmica seca. As soluções expostas às diferentes condições foram comparadas com soluções branco expostas às mesmas condições e períodos, contribuindo para a identificação adequada dos produtos de degradação (Figura 21 e Figura 22).

FIGURA 21 - CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES SUBMETIDAS ÀS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO



NOTA: PD, produto de degradação; Azul, condição ácida; Vermelho, condição básica; Rosa, condição oxidativa; Verde escuro, condição umidade; Verde claro, condição temperatura.

FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES (a) AMOSTRA CONTROLE, CONDIÇÕES (b) BÁSICA E (c) ÁCIDA, APÓS 36 HORAS



NOTA: Superior - amostra controle; Intermediário - branco da condição básica (linha tracejada), condição básica (linha sólida); Inferior - branco da condição ácida (linha tracejada), condição ácida (linha sólida).

De posse das amostras contendo os produtos de degradação, a etapa seguinte foi o desenvolvimento do método cromatográfico indicativo de estabilidade. Tanto o metanol quanto a acetonitrila apresentaram bons perfis de eluição para o analito principal, com um pico bem simétrico, no entanto, a acetonitrila, por ser um modulador orgânico mais forte que o metanol, possibilitou um menor consumo de solvente para tempos de retenção equivalentes. No caso de métodos indicativos de estabilidade, nem sempre baixos tempos de retenção são sinônimos de qualidade, nesses casos deve-se aliar resolução cromatográfica entre picos com tempo de análise. A condição que apresentou melhor avaliação segundo esses critérios foi uma fase móvel contendo 35% de acetonitrila e 65% de água. O método de eluição escolhido foi isocrático, por propiciar maior estabilidade dos parâmetros cromatográficos como resolução e fator de capacidade, além de evitar etapa de reequilíbrio de composição de fases para análises subsequentes.

O fluxo de fase móvel que apresentou melhores resultados foi o de $0,35 \text{ mL min}^{-1}$. Em relação à temperatura da coluna, sabe-se que esse é um parâmetro que pode influenciar na separação, afetando a difusão do analito, viscosidade da fase móvel e entalpia de transferência do analito entre a fase estacionária e móvel. Em geral, o aumento de temperatura da coluna pode aumentar o coeficiente de difusão, resultando em picos mais estreitos e, ao mesmo tempo, pode diminuir o tempo de retenção dos analitos (GU et al., 2008). Entretanto, não foram observadas alterações significativas no tempo de retenção e perfil de degradação entre as temperaturas testadas (25°C , 30°C e 4°C). Sendo assim, optou-se por manter a temperatura da coluna em 25°C .

O volume de injeção que propiciou melhores resultados foi o de $20 \mu\text{L}$, valores menores diminuíram a relação sinal ruído, consequentemente sensibilidade do método, e valores maiores contribuíram para um alargamento do pico. Sabe-se que o alargamento dos picos cromatográficos pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles a saturação da capacidade da coluna devido a altas concentrações de analito. Portanto, para manter uma alta eficiência de separação é indicado o uso de baixos volumes de injeção (GUILLARME et al., 2010). Nas condições acima definidas, o tempo de retenção para o álcool perílico ficou em aproximadamente 5,6 minutos e o tempo total de corrida em 15 minutos. Apesar de parecer elevado o tempo de análise, tal tempo se justifica pelo

aparecimento de uma degradação com tempo de retenção aproximado de 11 minutos, além disso, optou-se por manter a corrida cromatográfica por cerca de 2,5 vezes o tempo de retenção do analito principal como prevenção a pequenas variações que podem ocorrer em uma rotina normal de análise (Figura 22).

Durante as diversas alterações realizadas nas condições cromatográficas, a avaliação da resolução cromatográfica foi parâmetro determinante na escolha da melhor condição. Para tanto foi considerado como aceitável um valor limite de resolução não menor que 1,5 entre picos adjacentes, pois se trata de um valor no qual a separação entre picos é completa a nível de linha de base. A pureza cromatográfica para o pico do POH também foi avaliada, sendo considerado como adequado valores maiores que 0,990 (Tabela 2).

TABELA 2 - TEMPOS DE RETENÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADO PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO E RESOLUÇÃO ENTRE PICOS

	Tempo de retenção POH (min)	Pureza de pico POH	Resolução	
			POH/PD3	PD4/POH
Ácida	5.6	997.4	2.052	2.156
Básica	5.6	999.8	2.629	N/A
Oxidativa	5.6	999.9	2.749	N/A
Umidade	5.6	999.9	2.657	N/A
Térmica seca	5.6	999.9	2.379	N/A

NOTA: POH, álcool perílico; PD, produto de degradação; N/A, resolução não se aplica porque o PD4 não foi observado na condição forçada.

Resumindo, para os analitos em questão, uma cromatografia satisfatória foi obtida utilizando as seguintes condições:

- Coluna cromatográfica XBridge: C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm);
- Fase móvel: Gradiente isocrático - canal A (água) e canal B (acetonitrila) - na proporção de 65:35 (v/v), respectivamente;
- Fluxo da fase móvel: 0,35 mL min⁻¹;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Temperatura da coluna: 25°C;

Apesar da avaliação da estabilidade de soluções analíticas ser amplamente difundida e usualmente realizada como etapa final da validação analítica, entende-se que essa avaliação deve ser realizada ainda na fase de desenvolvimento analítico. Justifica-se tal hipótese no fato de que caso uma solução analítica não tenha estabilidade adequada, a validação analítica torna-se inviável gerando perdas de solventes e consumíveis, tempo de equipamento e analista. Caso a validação seja realizável, sérias limitações podem estar relacionadas ao método analítico. Conforme apresentado na Tabela 3, soluções estoque do analito de interesse quando armazenadas em geladeira a 4°C por 7, 14 e 30 dias permaneceram estáveis durante todo o período avaliado. A solução estoque mantida a 20°C por 6 horas também demonstrou estabilidade adequada no período avaliado. No caso da solução analítica a estabilidade foi avaliada em um período de 12 horas a 20°C, demonstrando adequada estabilidade. A avaliação da estabilidade foi verificada através de ferramentas estatísticas de teste *F* e teste *t* para comparação dos resultados obtidos com os resultados considerados de referência. No caso, todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram menores que os valores de t_{tabelado} , aceitando-se a hipótese nula de que há igualdade entre as médias (nível de confiança de 95%). Adicionalmente, os valores de *p* foram menores que α (0,05) sugerindo que a hipótese nula deve ser aceita.

TABELA 3 - RESULTADOS OBSERVADOS NA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÃO ANALÍTICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Concentração de referência (mg mL ⁻¹ ± DP)	Condição do estudo	Concentração observada (mg mL ⁻¹ ± DP)	$t_{\text{calculado}}^a$	t_{tabelado}^b	Valor <i>p</i>
0,0504 ± 0,000073	A7	0,0502 ± 0,000048	2,45	2,78	0,0225
	A14	0,0501 ± 0,000024	2,13		0,0044
	A30	0,0506 ± 0,000074	2,51		0,0102
0,0520 ± 0,000199	B6	0,0517 ± 0,000059	2,7399	2,78	0,0519
	B12	0,0518 ± 0,000102	2,1015		0,1034

NOTA: A7, solução estoque armazenada por 7 dias a 4°C; A14, solução estoque armazenada por 14 dias a 4°C; A30, solução estoque armazenada por 30 dias a 4°C; B6, solução estoque armazenada por 6 horas a 20°C; B12, solução analítica armazenada por 12 horas a 20°C; ^a, *t* calculado considerando intervalo de confiança de 95%; ^b *t* tabelado para 4 graus de liberdade. desvios padrão calculados com base em *n* = 3.

5.2.2 Validação do método analítico por CLAE-DAD

A seletividade foi comprovada através da verificação da capacidade do método em discriminar o POH, mesmo na presença de outros componentes da matriz, como excipientes e produtos de degradação. A inspeção visual do cromatograma do diluente, placebo e brancos das soluções forçadas à degradação evidenciaram que, no método proposto, não houve eluição de nenhum pico no mesmo tempo de retenção do álcool perílico. Adicionalmente, a avaliação dos cromatogramas das amostras forçadas à degradação demonstrou que existe separação cromatográfica adequada, com resoluções maiores que 1,5, e pureza de pico satisfatória para o álcool perílico (maiores que 0,99) indicando não haver coeluição com outros compostos (Tabela 4).

TABELA 4 - DADOS DE RESOLUÇÃO ENTRE PICOS E PUREZA DE PICO PARA O ÁLCOOL PERÍLICO PARA AS AMOSTRAS SUBMETIDAS ÀS DIFERENTES CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO

	Ácida		Básica		Umidade		Oxidativa		Térmica	
	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
PD1	2,2	N/A	(-)	N/A	(-)	N/A	(-)	N/A	(-)	N/A
PD2	(-)	N/A	3,6	N/A	(-)	N/A	(-)	N/A	(-)	N/A
PD3	4,7	9,35	4,7	2,97	4,7	N/A	4,7	N/A	4,7	N/A
Álcool Perílico	5,6	2,05	5,6	2,63	5,6	2,75	5,6	2,66	5,6	2,38
PD4	6,2	6,22	(-)	N/A	(-)	9,75	(-)	N/A	(-)	8,48
PD5	10,1	N/A	(-)	N/A	10,1	N/A	10,1	9,60	10,1	NA
Pureza de pico POH	997,4		999,8		999,9		999,9		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente a produto de degradação não observado; N/A, determinação de resolução não se aplica.

Adicionalmente, foi verificado o efeito da matriz demonstrando-se paralelismo entre as curvas analíticas de solução padrão em diluente e de matriz adicionada de padrão. Quando as inclinações das curvas de regressão linear são equivalentes, o único efeito de matriz presente trata-se da interferência natural causada pelo nível básico do analito. Portanto pode-se afirmar que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, sendo o método seletivo. A avaliação do paralelismo foi realizada por meio de comparação por teste *t*, considerando nível de significância de 5%. Na Tabela 5 são apresentados os valores dos coeficientes angulares para as diferentes

curvas. Pode-se verificar que o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor que t_{tabelado} (considerando 28 graus de liberdade, significância de 5%), concluindo-se que há paralelismo entre os coeficientes angulares.

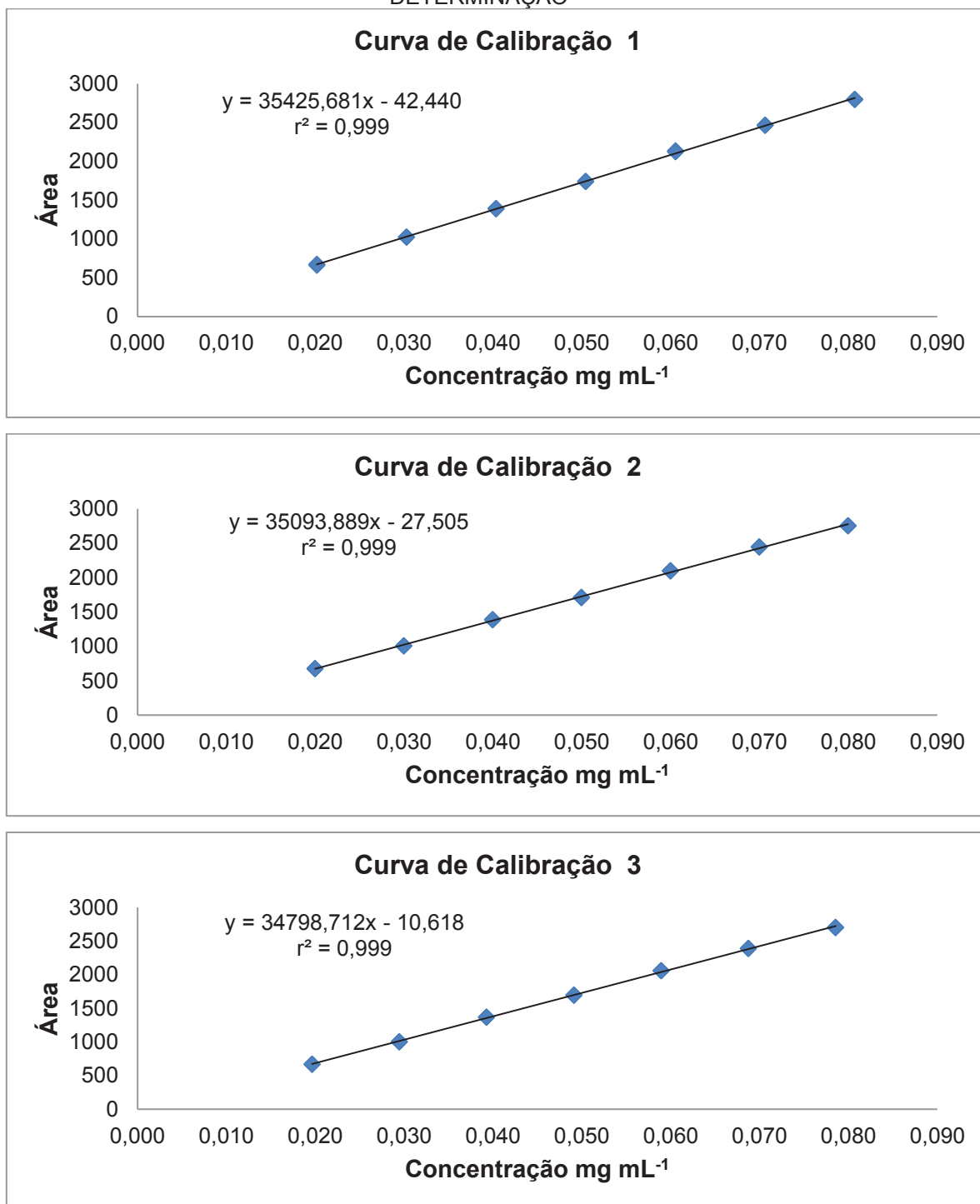
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO PARALELISMO ENTRE COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS PARA AS CURVAS ANALÍTICA DE PADRÃO DE POH E AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO

Curva	Coeficiente angular	Média	Desvio padrão relativo ^a	$t_{\text{calculado}}^b$	t_{tabelado}^c
CA	35425,68	35106,09	0,677	-1,02	1,699
	35093,89				
	34798,71				
CAP	35427,07	35303,05	0,677	-1,02	1,699
	35297,43				
	35184,63				

NOTA: CA, curva analítica; CAP, curva analítica adicionada de padrão; ^a Desvio padrão relativo da diferença dos coeficientes angulares; ^b t calculado considerando intervalo de confiança de 95%, 21 observações para cada curva de calibração de CA e 9 observações para cada curva de calibração de CAP; ^c t tabelado para 28 graus de liberdade a 5 % de significância.

A linearidade foi avaliada através da avaliação de três curvas analíticas independentes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, obtendo-se os gráficos de dispersão (equação da reta), coeficiente angular, intercepto e coeficientes de determinação (r^2) (Figura 23).

FIGURA 23 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO OBTIDOS PARA A TRIPLICATA DE CURVAS DE CALIBRAÇÃO, RESPECTIVAS EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO

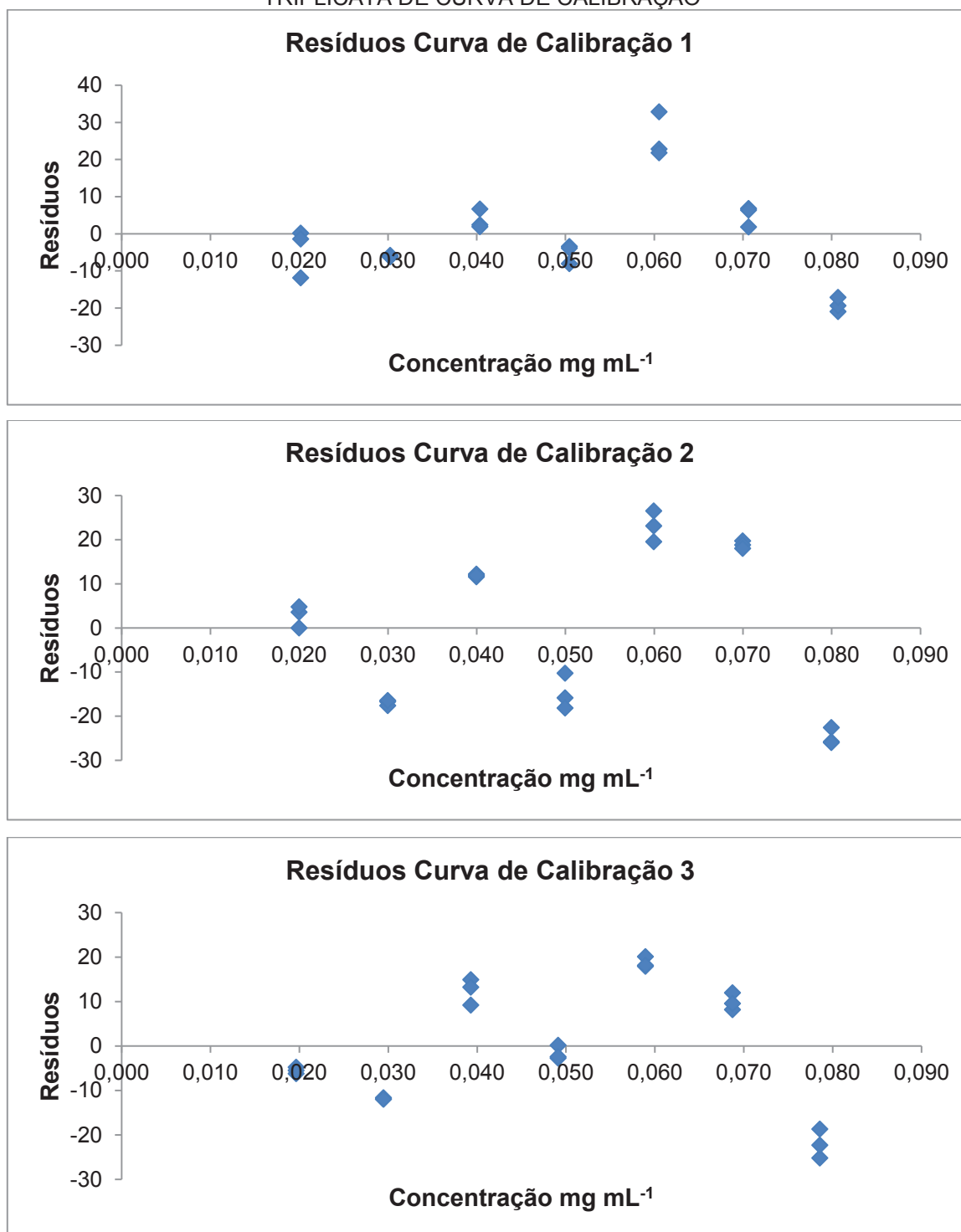


NOTA: Eixo Y: Área do álcool perílico; Eixo X: Concentração do álcool perílico na solução analítica.

Os valores de coeficiente de determinação (r^2), determinados por regressão, para todas as curvas de calibração foram maiores que 0,99, indicando uma boa correlação linear. A verificação da igualdade das variâncias e

homocedasticidade para cada curva foi avaliada pelo teste de *Cochran*, tendo como hipótese nula a homocedasticidade. Os valores calculados para *C* foram: curva de calibração 1 – 0,407; curva de calibração 2 – 0,414; curva de calibração 3 – 0,387, todos menores que *C* tabelado de 0,561 (7 pontos da curva e 3 réplicas para a variável *y*) sugerindo que a hipótese nula é aceitável, ou seja, as variâncias são homocedásticas. A significância dos coeficientes angulares das retas estimadas foi verificada através da análise de variância (ANOVA) e emprego de teste *F* ($F_{\text{tabelado}} = 4,381$, considerando distribuição de probabilidade *F* de Snedecor com 1 grau de liberdade no numerador e *n*-2 graus de liberdade no denominador ao nível de significância de 5%). Os valores de $F_{\text{calculado}}$ para as curvas foram: curva de calibração 1: – 55577,6; curva de calibração 2 – 29997,5; curva de calibração 3 – 48517,1, todos maiores que F_{tabelado} indicando que os modelos propostos são adequados para descrever o fenômeno. A avaliação dos gráficos dos resíduos (Figura 24) mostrou que há um comportamento aleatório na distribuição dos pontos ao redor do eixo *x*, não apresentando nenhum comportamento regular ou tendência.

FIGURA 24 - GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS OBSERVADOS PARA A TRIPLICATA DE CURVA DE CALIBRAÇÃO



Adicionalmente, as três curvas de calibração foram comparadas entre si verificando a equivalência entre elas. Para tanto, determinou-se os fatores resposta de cada ponto das curvas através da razão entre área e concentração. Os valores de fator resposta dos três grupos foram analisados por ANOVA fator único (amostras não pareadas). O valor de $F_{\text{calculado}}$ (0,2354) foi menor que o

valor de F_{tabelado} (3,1588), indicando haver equivalência entre as médias dos três grupos.

A repetibilidade foi avaliada através de nove análises de determinação contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. Os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo para cada nível são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA AS AMOSTRAS DA REPETIBILIDADE

Análise	Concentração POH mg mL ⁻¹ ± DP (n = 3)	Desvio padrão (n = 9)	Desvio padrão relativo (n = 9)
Baixa	0,0192 ± 0,000028	0,00054	2,75
	0,0197 ± 0,000023		
	0,0204 ± 0,000063		
Média	0,0499 ± 0,000128	0,00028	0,56
	0,0496 ± 0,000428		
	0,0498 ± 0,000073		
Alta	0,0808 ± 0,000045	0,00041	0,51
	0,0805 ± 0,000467		
	0,0808 ± 0,000618		

NOTA: DP – Desvio padrão.

A precisão intermediária, assim como a repetibilidade foi determinada por nove análises de determinação em três diferentes concentrações, porém executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento e em um intervalo de tempo de dois dias. Os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo para cada nível desse grupo de amostras são apresentados na Tabela 7. A avaliação da precisão intermediária foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre os diferentes analistas, por meio de teste t , verificando-se a homogeneidade das variâncias e médias em cada nível de concentração. Os valores obtidos para $t_{\text{calculado}}$ foram todos menores que $t_{\text{crítico}}$, indicando que as médias comparadas são estatisticamente equivalentes.

TABELA 7 - DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA AS AMOSTRAS DA PRECISÃO E AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Análise	Concentração POH mg mL ⁻¹ ± DP (n = 3)	Desvio padrão (n = 9)	Desvio padrão relativo (n = 9)	t _{calculado}	t _{tabelado}
Baixa	0,0184 ± 0,000149	0,00055	2,91	-1,946	2,119
	0,0196 ± 0,000014				
	0,0187 ± 0,000028				
Média	0,0510 ± 0,000056	0,00078	1,55	0,992	2,228
	0,0495 ± 0,000497				
	0,0496 ± 0,000119				
Alta	0,0806 ± 0,000020	0,00030	0,37	1,909	2,119
	0,0801 ± 0,000060				
	0,0808 ± 0,000688				

NOTA: DP – Desvio padrão; Teste *t* de *Student*, nível de confiança de 95% (valores de *p*: baixa – 0,069; média – 0,334; alta – 0,074).

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, comparando-se a porcentagem de recuperação de concentração com a respectiva concentração teórica. Os valores de exatidão obtidos foram satisfatórios, com recuperações na faixa de 98,07 – 101,99%. Resultados de concentrações e recuperações são apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE EXATIDÃO

Nível	Concentração teórica POH mg mL ⁻¹	Concentração POH mg mL ⁻¹ ± DP (n = 3)	Recuperação (%) ± DP (n = 9)
Baixa	0,020	0,020 ± 0,000023	100,99 ± 0,74
		0,020 ± 0,000123	
		0,020 ± 0,000260	
Média	0,050	0,050 ± 0,000049	99,06 ± 0,33
		0,050 ± 0,000096	
		0,050 ± 0,000058	
Alta	0,079	0,080 ± 0,000083	99,34 ± 0,51
		0,080 ± 0,000026	
		0,080 ± 0,000755	

NOTA: DP - Desvios padrão.

Com base nos resultados de linearidade, exatidão e precisão, o intervalo do método ficou definido na faixa de 0,020 a 0,080 mg mL⁻¹.

Para a avaliação da robustez do método analítico, foram consideradas apenas variações passíveis de ocorrência e intervalos coerentes considerando equipamento, ambiente e método. Solução padrão e solução amostra foram analisadas nas diferentes condições de variação e os resultados foram avaliados como porcentagem da concentração recuperada do analito frente aos resultados obtidos para as mesmas soluções na condição normal do método. Para todas as condições os valores de recuperação ficaram dentro do intervalo de 98 – 102%, conforme demonstrado na Tabela 9.

TABELA 9 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA O ALCOOL PERILICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS NA ROBUSTEZ

Condição avaliada	Solução	Concentração POH mg mL ⁻¹ ± DP	Recuperação (%) ± DP
Condição normal	Padrão	0,052 ± 0,000622	100
	Amostra	0,048 ± 0,000080	100
Fluxo 0,34 mL min ⁻¹	Padrão	0,052 ± 0,000042	99,67 ± 0,08
	Amostra	0,048 ± 0,000078	100,49 ± 0,16
Fluxo 0,36 mL min ⁻¹	Padrão	0,052 ± 0,000562	99,78 ± 1,09
	Amostra	0,049 ± 0,000064	100,85 ± 0,13
Forno a 23°C	Padrão	0,051 ± 0,000149	98,22 ± 0,29
	Amostra	0,048 ± 0,000337	98,96 ± 0,70
Forno a 28°C	Padrão	0,052 ± 0,000109	99,76 ± 0,21
	Amostra	0,048 ± 0,000057	99,02 ± 0,12
34% Acetonitrila na fase móvel	Padrão	0,052 ± 0,000031	101,00 ± 0,06
	Amostra	0,047 ± 0,000138	98,52 ± 0,29
36% Acetonitrila na fase móvel	Padrão	0,053 ± 0,000451	101,43 ± 0,87
	Amostra	0,048 ± 0,000065	100,69 ± 0,14
Lote coluna	Padrão	0,052 ± 0,000179	101,24 ± 0,35
	Amostra	0,049 ± 0,000182	100,91 ± 0,38

NOTA: DP - desvios padrão calculados com base em $n = 3$

No caso das soluções forçadas à degradação, essas também foram avaliadas no ensaio de robustez como forma de verificar a capacidade do método em ser indicativo de estabilidade, ou seja, manter uma separação adequada mesmo com variações deliberadas nos parâmetros cromatográficos. A avaliação foi realizada através da verificação da resolução entre picos adjacentes, sendo apenas as soluções forçadas à degradação em meio ácido,

básico e oxidativo testadas. A seleção dessas três condições foi fundamentada no fato das mesmas contemplarem todas as cinco degradações observadas durante o estudo de perfil de degradação, reduzindo assim o tempo de análise e consumo de solvente. Em todas as condições avaliadas as resoluções entre picos foram maiores que 1,5, sugerindo boa separação cromatográfica. Além disso, as purezas de pico para o álcool perílico foram todas adequadas, indicando não haver coeluições de impurezas com o analito de interesse (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14, Tabela 15 e Tabela 16).

TABELA 10 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FLUXO 0,34 mL min⁻¹

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
Fluxo 0,34 mL min ⁻¹	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	9,35	4,7	2,84	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	2,05	5,6	2,61	5,6	2,67
	PD 4	6,2	6,17	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,46
Pureza de pico		993,4		999,1		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente à produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 11 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FLUXO 0,36 mL min⁻¹

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
Fluxo 0,36 mL min ⁻¹	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	9,427	4,7	2,876	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	2,065	5,6	2,589	5,6	2,658
	PD 4	6,2	6,342	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,709
Pureza de pico		997,3		999,8		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente à produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 12 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FORNO A 23°C

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
Forno 23°C	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	7,242	4,7	2,910	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	1,743	5,6	2,639	5,6	2,663
	PD 4	6,2	6,216	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,363
Pureza de pico		995,5		999,8		999,8	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente á produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 13 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE FORNO A 28°C

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
Forno 28°C	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	6,675	4,7	2,923	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	1,748	5,6	2,561	5,6	2,658
	PD 4	6,3	6,752	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,229
Pureza de pico		993,7		999,8		999,8	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente á produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 14 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE 34% DE ACN NA FASE MÓVEL

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
34% Acetonitrila na fase móvel	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	6,884	4,7	2,420	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	1,728	5,6	2,453	5,6	2,496
	PD 4	6,3	6,508	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,451
Pureza de pico		997,6		995,2		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente á produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 15 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE 36% DE ACN NA FASE MÓVEL

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
36% Acetonitrila na fase móvel	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	8,622	4,7	2,435	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	2,033	5,6	2,468	5,6	2,507
	PD 4	6,2	6,433	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,311
Pureza de pico		990,1		997,4		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente á produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

TABELA 16 - VALORES DE RESOLUÇÃO E PUREZA DE PICO OBSERVADOS PARA O ÁLCOOL PERÍLICO NA CONDIÇÃO DE DIFERENTE LOTE DE COLUNA

Parâmetro da robustez	Pico cromatográfico	Ácida		Básica		Oxidativa	
		<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>	<i>tr</i>	<i>Rs</i>
Lote coluna	PD 1	2,2	NA	(-)	NA	(-)	NA
	PD 2	(-)	NA	3,6	NA	(-)	NA
	PD 3	4,7	7,312	4,7	2,825	4,7	NA
	Álcool Perílico	5,6	1,763	5,6	2,597	5,6	2,670
	PD 4	6,2	6,210	(-)	NA	(-)	NA
	PD 5	(-)	NA	(-)	NA	10,2	9,502
Pureza de pico		994,2		997,1		999,9	

NOTA: *tr*, tempo de retenção em minutos; *Rs*, resolução; (-), pico referente á produto de degradação não observado na condição; NA, determinação de resolução não se aplica.

5.3 Preparação caracterização de micropartículas contendo POH

O uso de copolímeros biodegradáveis, a exemplo do PLA-*b*-PEG, como plataforma de carregamento de fármacos hidrofóbicas têm sido descritos para diversos agentes terapêuticos como paclitaxel, doxorubicina e até mesmo óleos essenciais (BOISSENOT, 2016; LEE, 2015; MARTINS, 2014; MEUNIER, 2017). Nesta etapa do estudo, o potencial de aplicação do PLA-*b*-PEG como plataforma de carregamento para o POH foi avaliado, determinando-se parâmetros relevantes como a influência de diferentes surfactantes, a concentração adequada para o uso, a cinética de degradação do polímero, a influência na liberação do fármaco e o potencial citotóxico do sistema encapsulado.

5.3.1 Propriedades interfaciais

O encapsulamento de fármacos hidrofóbicos e voláteis em cápsulas poliméricas trata-se de um processo estritamente dependente do tipo de tensoativo utilizado, assim como, dos componentes da matriz (LACAVA et al., 2014; O'DONNELL; MCGINITY, 1997). Na literatura foi demonstrado que distintos perfis morfológicos e tamanhos de partículas podem ser obtidos de acordo com as características comportamentais que ocorrem entre polímero e fármaco na interface O/A. Sendo estes, influenciados pelo surfactante presente na amostra (RAMAZANI et al., 2016). A técnica de emulsificação-evaporação do solvente envolve processos dinâmicos para a formação de micro e nanossistemas, ou seja, as gotículas de emulsão contendo o polímero e fármaco são induzidas a se solidificar conforme o solvente se evapora. O uso de um surfactante adequado e, principalmente, na concentração correta é de fundamental importância para o bom desempenho do processo. A escolha correta do surfactante contribui para a obtenção de sistemas homogêneos (tamanho e forma), assim como para uma excelente EE (%).

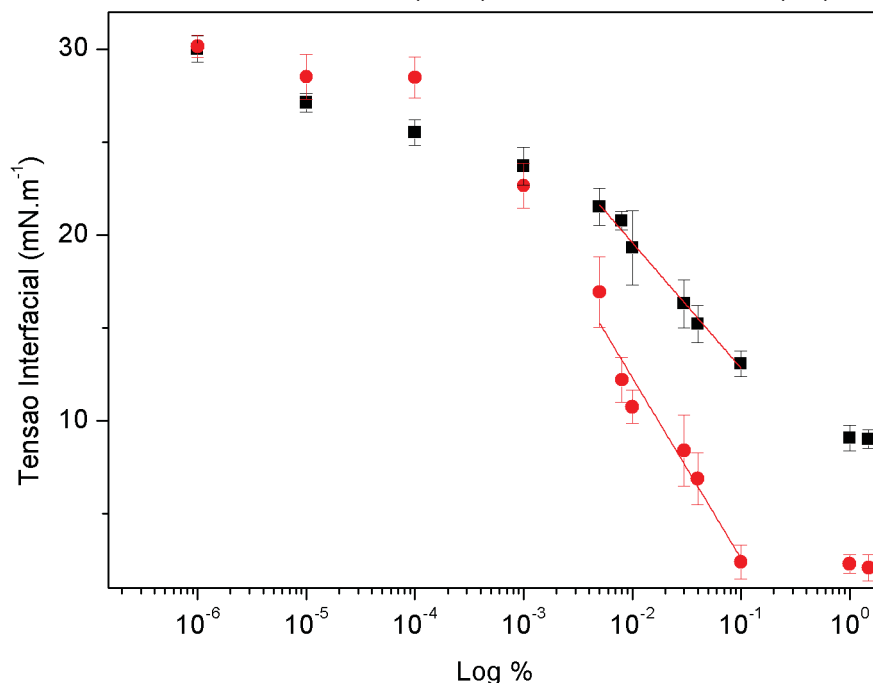
A avaliação das propriedades interfaciais foi realizada pela técnica da gota pendente. Basicamente, ao se formar uma gotícula de solvente orgânico na ponta de uma agulha, dentro de uma fase aquosa contendo surfactante, o balanço das interações entre cadeias carbônicas e água direcionará as moléculas de surfactante para a interface da gota. Quando a superfície da gota estiver completamente tomada por moléculas de surfactante, a tensão interfacial é mínima e, dessa forma, estabiliza-se adequadamente o sistema emulsionado. Caso haja um excesso de surfactante, ocorrerá formação de micro domínios hidrofóbicos. Já uma quantidade insuficiente de surfactante acarretará na baixa estabilização devido a alta tensão interfacial (BERG, 2010). O uso de quantidades inadequadas de surfactante pode acarretar na desestabilização do sistema emulsionado incorrendo na coalescência, crescimento, redução da encapsulação, dificuldades de remoção de excesso de surfactante, etc.

Como para a técnica pretendida faz-se necessário o uso de solvente orgânico e aquoso, a tensão interfacial foi determinada entre uma fase aquosa contendo surfactantes e uma fase orgânica composta por clorofórmio. Dois diferentes surfactantes foram avaliados, o álcool poli vinílico (PVAI) e colato de

sódio (SC), em diferentes concentrações. PVAI é um surfactante polimérico não iônico e o SC é um surfactante iônico, sendo ambos largamente utilizados na obtenção de micro e nanossistemas de entrega de fármacos, obtidos por emulsificação seguida de evaporação (DIOU et al., 2014; EL-HAMMADI et al., 2017; HOUVENAGEL et al., 2017; MENON et al., 2012; PISANI et al., 2008).

Conforme a Figura 25, pôde-se observar que o PVAI apresentou maior atividade superficial quando comparado ao SC. Na concentração de 0,01% (p/v), o PVAI reduziu a tensão interfacial para $12,2 \pm 2,4 \text{ mN m}^{-1}$ contra $20,8 \pm 0,5 \text{ mN m}^{-1}$ do SC. Com o aumento para a concentração de 0,04% (p/v), o PVAI diminuiu a tensão interfacial para $9,6 \pm 2,7 \text{ mN m}^{-1}$ enquanto o SC reduziu para $15,2 \pm 1,33 \text{ mN m}^{-1}$. Em altas concentrações, 1,0% ou 1,5% o mesmo perfil de redução da tensão interfacial foi observado, uma vez que ambos os surfactantes atingiram a concentração micelar crítica (CMC) (BOURY et al., 1995). Nessas concentrações o PVAI reduziu para um mínimo de $2,3 \pm 0,8 \text{ mN m}^{-1}$ enquanto o SC reduziu para $9 \pm 2 \text{ mN m}^{-1}$.

FIGURA 25 - MEDIDAS DA TENSÃO INTERFACIAL (mN m^{-1}) DE ACORDO COM O LOG DA CONCENTRAÇÃO (mmol L^{-1}) E CONCENTRAÇÃO PERCENTUAL DOS SURFACTANTES ÁLCOOL POLIVINÍLICO (PVAI) E COLATO DE SÓDIO (SC)



NOTA: PVAI – quadrados pretos; SC – círculos vermelhos; Eixo X inferior – escala em Log do percentual de surfactante. As linhas sólidas (vermelho) correspondem as retas de regressão entre a variação tensão interfacial e variação concentração ($d\gamma/d\text{Log}C$).

Para o PVAI nas concentrações de 1,0% e 1,5%, durante as mensurações das propriedades interfaciais, foi observada certa instabilidade das gotas, possivelmente em função da continua reorganização do surfactante na interface devido ao excesso superficial. Situação similar foi previamente observada por PISANI et al. (2008). Para estas amostras, as medidas foram baseadas em imagens tiradas após 10 segundos, a fim de possibilitar um melhor equilíbrio do surfactante na interface. Em concentrações mais baixas de PVAI, as gotas foram mais estáveis, evidenciando que a superfície não estava completamente ocupada pelo tensoativo.

Após a concentração de agregação crítica (CAC) ser atingida, a organização interfacial foi caracterizada por um maior excesso de PVAI em comparação ao SC, como mostrado na Tabela 17. Tais resultados são consistentes com um estudo descrito por BOURY et al. (1995) e estão relacionados à organização assimétrica que ocorre devido à ancoragem do segmento caudal do PVAI na interface clorofórmio/água, refletindo a interpenetração molecular na fase solvente, o que aumenta a pressão superficial. Por outro lado, o SC exibiu deposição mais regular em toda a interface, exibindo valores de área mínima menores e excesso superficial mais alto do que o obtido com PVAI.

TABELA 17 - VALORES DE EXCESSO SUPERFICIAL MÁXIMO, ÁREA MÍNIMA OCUPADA POR MOLÉCULA DE SURFACTANTE E PRESSÃO SUPERFICIAL NA INTERFACE CLOROFÓRMIO/ÁGUA PARA O ÁLCOOL POLIVINILICO E COLATO DE SÓDIO

Interface	Γ_{max} (mol m ⁻²)	a_{min} (nm ²)	π_{cmc} (mN m ⁻¹)
Colato de Sódio/CHCl ₃	1,0 x 10 ⁻⁶	1,60	21
Álcool poli vinílico/CHCl ₃	1,7 x 10 ⁻⁶	0,95	28

NOTA: Γ_{max} , excesso superficial máximo na interface; a_{min} área mínima ocupada por uma molécula de surfactante; π_{cmc} é a pressão superficial.

Na presença do copolímero PLA-*b*-PEG observou-se uma diminuição significativa na tensão interfacial, de 29,6 ± 0,2 mN m⁻¹ (clorofórmio/água pura) para 23,9 ± 0,3 mN m⁻¹ (clorofórmio com 20 mg mL⁻¹ de polímero), como mostrado na Tabela 18. Estes resultados estão de acordo com OWENS III; PEPPAS (2006), que demonstraram adesão efetiva e irreversível de unidades PEGuiladas em interfaces hidrofílicas. A solução de POH a 20 mg mL⁻¹, com ou

sem o polímero, exibiu valores similares, mostrando que o fármaco não apresentava atividade interfacial.

TABELA 18 - MEDIDAS DE TENSÃO INTERFACIAL ENTRE FASES CLOROFÓRMIO/ÁGUA CONTENDO SURFACTANTES COLATO DE SÓDIO 1,5%, ÁLCOOL POLIVINÍLICO 1,0%, PLA-*b*-PEG E ÁLCOOL PERÍLICO

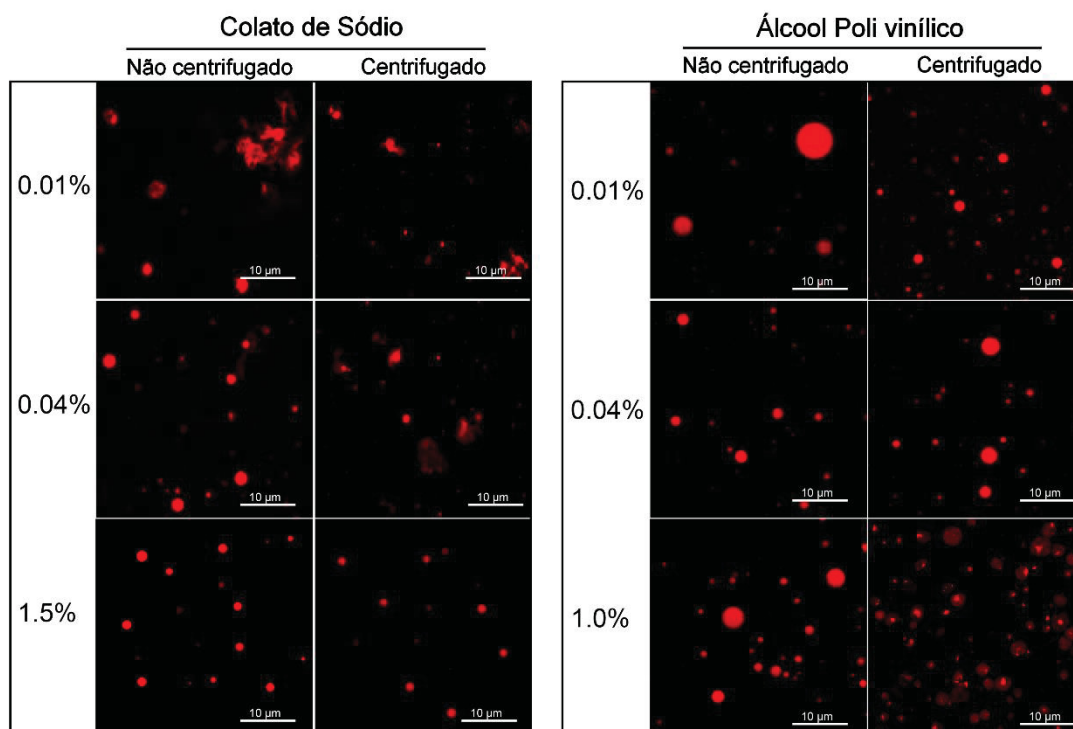
Fase da Gota	Fase cubeta (mN/m)		
	Água	PVAI 1,0% (p/v)	SC 1,5% (p/v)
CHCl ₃	29,6 ± 1,0	2,3 ± 0,8	9,0 ± 0,2
PLA- <i>b</i> -PEG (CHCl ₃)	23,9 ± 0,3	2,4 ± 0,8	8,5 ± 0,1
Álcool perílico (CHCl ₃)	25,0 ± 0,3	2,0 ± 0,8	8,7 ± 0,2
PLA- <i>b</i> -PEG + Álcool Perílico (CHCl ₃)	24,9 ± 0,4	2,5 ± 0,6	7,9 ± 0,1

NOTA: PVAI – álcool polivinílico; SC – colato de sódio; PLA-*b*-PEG em CHCl₃: 20 mg mL⁻¹, álcool perílico em CHCl₃: 20 mg mL⁻¹; PLA-*b*-PEG + álcool perílico em CHCl₃: ambos a 20 mg mL⁻¹. Todos os resultados estão expressos como média e desvio padrão de sextuplicata.

5.3.2 Influência do surfactante nas microcápsulas

Baseado na habilidade dos surfactantes em estabilizar a interface clorofórmio/água, para formular as microcápsulas foram selecionadas as concentrações de 0,01 e 0,04% para PVAI e SC, 1,0% para PVAL e 1,5% para SC. Na concentração mais baixa de SC (0,01%) apenas partículas com formato irregular foram observadas. Esfericidade foi observada apenas em concentrações maiores que 0,04% de SC (Figura 26). Comparativamente, PVAI foi capaz de gerar microcápsulas esféricas mesmo na concentração mais baixa (0,01%). Provavelmente, devido à menor tensão interfacial gerada por este surfactante ($12,2 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$ a 0,01% *versus* $20,8 \pm 0,5 \text{ mN m}^{-1}$ a 0,01% para SC) a estabilidade interfacial foi maior e mais efetiva ao longo do processo de evaporação do solvente. Estes resultados podem ser correlacionados com as características do surfactante e conformação assumida na interface clorofórmio/água. Possivelmente devido ao maior peso molecular ($30.000 \text{ g mol}^{-1}$), o PVAI é capaz de estabelecer mais pontos de interação com a fase orgânica do que o SC, gerando assim uma maior pressão superficial na interface (Tabela 17).

FIGURA 26 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA A LASER CONFOCAL OBTIDAS PARA AS MICROCÁPSULAS FORMULADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SURFACTANTES



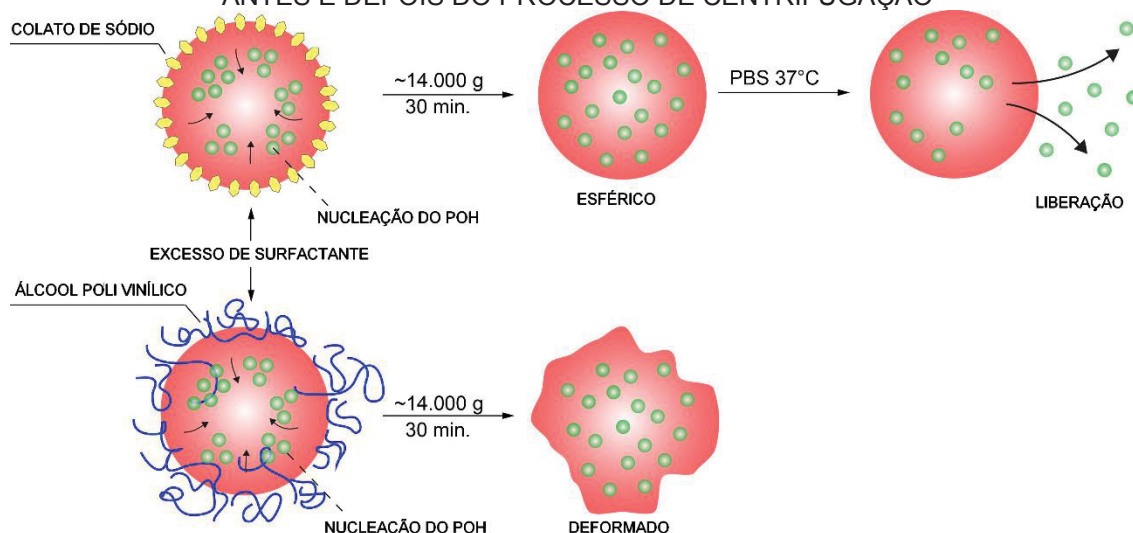
NOTA: Formulações com colato de sódio e álcool polivinílico; Imagens adquiridas antes e após centrifugação ($14.000 \times g$, 15 min, 4°C). Vermelho do Nilo foi usado como agente fluorescente na fase contendo PLA-*b*-PEG/POH.

As variações na quantidade de surfactante também desenvolveram um importante papel na manutenção da integridade das microcápsulas. Como a centrifugação é necessária para a purificação e determinação da EE (%), conhecer o impacto dessa operação no perfil das partículas a serem desenvolvidas é de extrema importância. Quando as microcápsulas foram submetidas a um ciclo de centrifugação a $14.000 \times g$, 15 min, 4°C , as formulações contendo 0,01 e 0,04% de SC perderam completamente a forma, exibindo a presença de agregados e cápsulas, o que sugere uma agregação copolimérica desigual nestas tensões interfaciais (Figura 26). Por outro lado, PVAI a 0,01 e 0,04% se mostraram capazes de manter a morfologia das microcápsulas após a centrifugação, demonstrando maior homogeneidade no processo de migração copolimérica para a interface e consequente nucleação do POH, consequentemente, maior estabilidade das formulações.

Portanto, pode-se sugerir que o PVAI em baixas concentrações proporcionou maior rigidez superficial em comparação às amostras preparadas com a mesma quantidade de SC, devido à uma organização mais compacta. Estas observações estão de acordo com o observado por BOURY et al. (1995), quanto à organização do PVAI na interface água/ CHCl_3 . Sugere-se que, no início da precipitação do polímero, o PLA-*b*-PEG pode migrar homogeneamente e espalhar-se pela interface, conferindo rigidez às cápsulas, que se tornam menos sensíveis à tensão de cisalhamento imposta pela centrifugação. Esta condição não é completamente atingida com pequenas quantidades de SC, provavelmente devido à migração irregular do polímero e POH, o que leva à deposição de zonas menos densas de polímero perto da interface, levando consequentemente à deformação durante a centrifugação.

Interessantemente, quando a concentração usada de tensoativo foi maior que a CMC (1,5% para SC e 1,0% para PVAI), apenas as formulações obtidas com SC foram capazes de manter a esfericidade após centrifugação (Figura 26). Esses resultados sugerem que, em altas concentrações, a interface é mais bem organizada com o surfactante SC. Para altas concentrações de PVAI, provavelmente parte do tensoativo é englobado na fase orgânica e, conforme o solvente evapora, uma certa quantidade de PVAI pode permanecer embebida na camada polimérica. Dessa forma uma menor rigidez ocorre devido à acomodação irregular do PLA-*b*-PEG, conforme sugere-se na Figura 27. Além disso, como o PVAI é um polímero solúvel em água e apresenta um baixo valor de tensão interfacial com o polímero, a energia livre necessária para removê-lo das interfaces água-óleo também é reduzida (Equação 8) (DE FREITAS et al., 2016). Assim, o PVAI englobado na camada polimérica pode ser facilmente dessorvido da cápsula quando submetida a tensão de cisalhamento ou taxa de cisalhamento pela centrifugação.

FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL MORFOLÓGICO GERADO COM SURFACTANTE COLATO DE SÓDIO A 1,5% E ÁLCOOL POLIVINÍLICO A 1,0%, ANTES E DEPOIS DO PROCESSO DE CENTRIFUGAÇÃO



EQUAÇÃO 8 - ENERGIA LIVRE DE DESSORÇÃO DA INTERFACE.

$$\Delta G = \pi R^2 \gamma (1 \pm |\cos \theta|)^2$$

NOTA: ΔG é a energia livre de dessorção da interface, R é o raio da partícula, θ é o ângulo de contato com a interface, γ é a tensão interfacial.

Uma vez que no estudo pretendido busca-se nanoencapsular um fármaco líquido e que devido a essas características, a forma farmacêutica obtida trata-se de uma cápsula contendo um líquido e não uma partícula sólida contendo um fármaco sólido, o entendimento sobre a influência do surfactante na morfologia e aspectos relacionados a manutenção da estabilidade ao longo dos processos pelos quais as partículas estão sujeitas torna-se necessário.

5.3.3 Perfil de liberação *in vitro* das microcápsulas

Para o estudo de liberação *in vitro*, microcápsulas contendo o POH e fluoróforo vermelho do nilo foram produzidas de acordo com o procedimento descrito no item 4.8 (página 80). As concentrações de surfactante utilizadas foram PVAI a 1,0% e SC a 1,5%. As microcápsulas poliméricas produzidas apresentaram EE (%) de $68,8 \pm 0,6\%$ LC (%) de 41,1% com o uso de PVAI e EE (%) de $63,9 \pm 0,3\%$ e LC (%) de 39,0% com o uso de SC, conforme Tabela 19.

TABELA 19 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO, CAPACIDADE DE CARGA DE FÁRMACO E DIÂMETRO MÉDIO PARA AS MICROCAPSULAS OBTIDAS COM 1,5% DE COLATO DE SÓDIO E 1,0% DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO

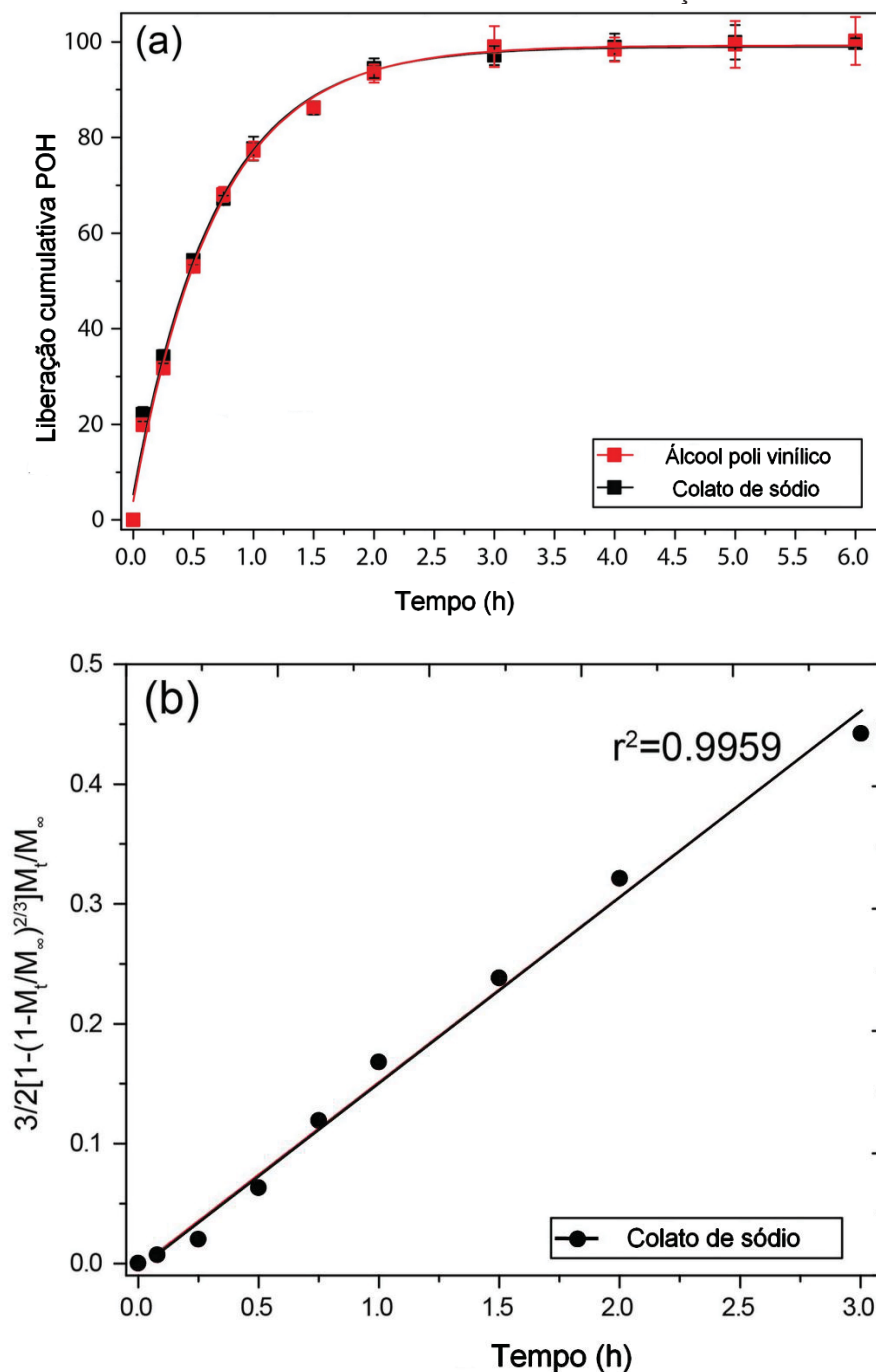
Copolímero /surfactante	Eficiência de encapsulação ^a (%)	Capacidade de carga ^a (%)	Diâmetro médio ^{a,b} (μ m)
PLA- <i>b</i> -PEG/PVAI	69,8 \pm 0,6	41,1 \pm 0,2	2,3 \pm 1,5
PLA- <i>b</i> -PEG/SC	63,9 \pm 0,3	39,0 \pm 0,1	1,8 \pm 0,6

NOTA: PVAI – álcool polivinílico; SC – colato de sódio; ^a resultados da média de 3 lotes; ^b Estimado por microscopia de varredura a laser confocal de no mínimo 100 microcapsulas por lote, no plano equatorial.

As formulações apresentaram alta EE (%) para o POH, quando comparada a partículas similares obtidas com o polímero PLGA e o mesmo fármaco (42%) (FARAZUDDIN et al., 2012). Os dados de eficiência de encapsulação e CLSM demonstraram que o teor de fármaco encapsulado e a morfologia da microcapsula foram mantidos quando armazenados a temperatura controlada (20°C) por pelo menos 24 h e por 7 dias quando armazenados a 4°C.

Nenhuma das amostras foi submetida à centrifugação para uma comparação efetiva entre os tensoativos utilizados e o processo de liberação *in vitro*. Ambas as amostras apresentaram perfis de liberação semelhantes, exibindo completa liberação do POH em até três horas (Figura 28a). Esse comportamento foi consistente com a liberação rápida de fármacos pouco solúveis em água, como paclitaxel e rapamicina, aprisionadas em micelas de PLA-*b*-PEG (SHIN et al., 2011), e possivelmente se deve à fina espessura da camada polimérica nas micropartículas.

FIGURA 28 - PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO ÁLCOOL PERÍLICO PARA AS MICROPARTICULAS DE PLA-*b*-PEG PREPARADAS COM COLATO DE SÓDIO E ÁLCOOL POLIVINILICO E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO



NOTA: (a) perfil de liberação *in vitro* para microcápsulas preparadas com álcool polivinílico a 1,0% (vermelho) e colato de sódio 1,5% (preto) em tampão PBS 0,1 mM e pH 7,4. (b) Perfil cinético de perfil de liberação pelo modelo de Baker-Lonsdale. Todos os resultados estão expressos como médias de 3 lotes.

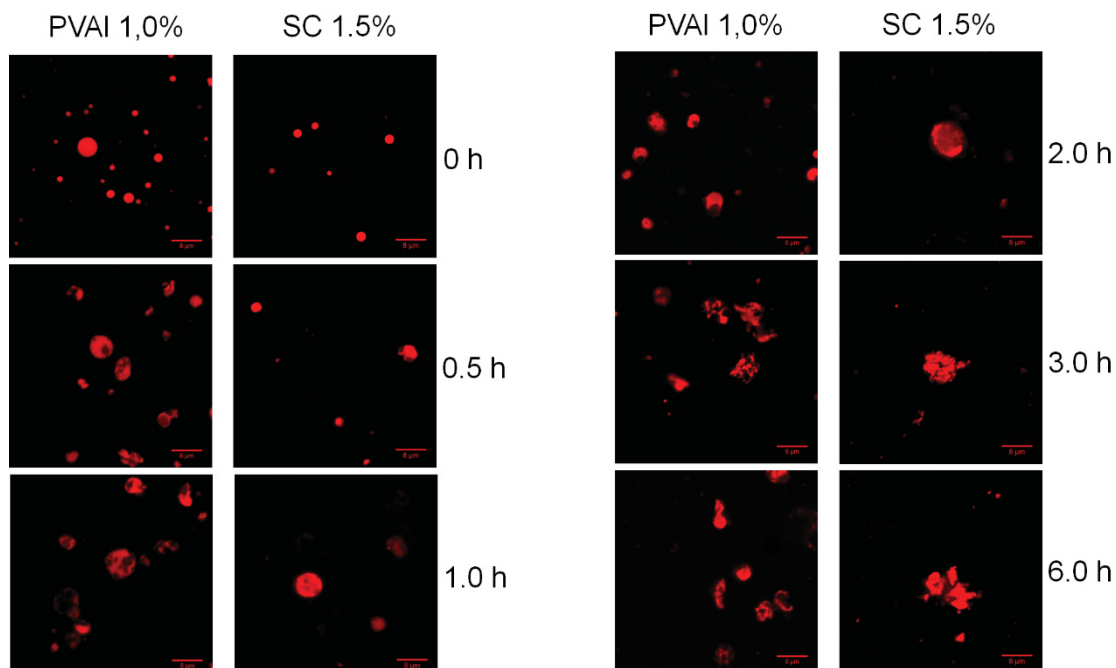
A evolução do perfil de liberação do POH nas microcápsulas foi acompanhada por CLSM. Inicialmente, as microcápsulas obtidas com ambos os surfactantes se apresentaram esféricas e foram gradualmente se deformando

durante a liberação (Figura 29). Como o fluoróforo Vermelho do Nilo tem afinidade tanto pelo copolímero como pelo POH, foi possível observar a evolução do aparecimento de morfologias distorcidas e regiões ausentes de polímero a partir de 30 minutos, indicando o deslocamento do POH de sua posição central na cápsula. Além disso, conforme o POH se difunde, a morfologia das cápsulas se modifica constantemente, apresentando formação de fraturas e irregularidades que facilitam a liberação do POH. Em três horas, no entanto, as microcápsulas preparadas com SC a 1,5% ainda apresentam zonas ricas em polímero, enquanto para o PVAI a 1,0% apenas se observa agregados e cápsulas rompidas. Após 6 horas, o POH está completamente liberado das cápsulas, mas ainda se observa estruturas deformadas.

A liberação cumulativa das microcápsulas e o perfil de difusão do fármaco não encapsulado, de dentro do saco de diálise foram comparados por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), com nível de confiança de 95%, entre os perfis de liberação das diferentes amostras. Portanto, a técnica de liberação *in vitro* por membrana de diálise não influenciou na liberação observada, devido as forças de difusão.

Na formulação inicialmente proposta, a razão entre polímero e fármaco foi de 1:1 (p/p), sendo observada uma elevada EE (%). Possivelmente, a massa de polímero por microcápsula não tenha sido suficientemente grande para formar uma camada espessa ao redor do núcleo de fármaco, o que incorreria em um perfil de liberação mais lento devido ao maior tempo necessário para degradação do polímero, formação de poros e difusão do fármaco (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008). Como o POH está contido na microcápsula na forma líquida, ele não necessita passar por uma etapa de solubilização para a liberação. Somado a isso, como o POH possui baixa densidade ($0,96 \text{ g mL}^{-1}$), a pressão interna aplicada sobre a fina camada polimérica pode ser alta o suficiente para induzir um perfil de liberação rápido.

FIGURA 29 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA A LASER CONFOCAL DAS MICROCAPSULAS FORMULADAS COM SURFACTANTES COLATO DE SÓDIO E ÁLCOOL POLIVINÍLICO, OBTIDAS EM DIFERENTES TEMPOS DE LIBERAÇÃO



Para elucidar o mecanismo de liberação observado, o perfil cinético foi ajustado aos modelos de ordem zero e primeira ordem, bem como aos modelos de Higuchi e Baker-Lonsdale. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 20 e na Figura 28b, o melhor coeficiente de correlação (r^2) foi observado para o modelo de Baker-Lonsdale. Este modelo é derivado do sistema planar de Higuchi e propõe a liberação do fármaco a partir de matrizes esféricas, como observado para as microcapsulas de PLA-*b*-PEG. Esse modelo também explica os mecanismos de difusão da liberação de fármaco a partir de microcapsulas de PLGA/quitosana (YAN et al., 2011). De acordo com esse modelo, se a matriz não for homogênea e apresentar fraturas, contribuições de tortuosidade e porosidade devem ser adicionadas para melhor representar as condições de liberação (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

TABELA 20 – CORRELAÇÃO DOS MODELOS CINÉTICOS DE ORDEM ZERO, PRIMEIRA ORDEM, HIGUCHI E BAKER-LONSDALE PARA AS MICROCÁPSULAS DE PLA-*b*-PEG CONTENDO ÁLCOOL PERÍLICO

Amostra	r^2			
	Ordem zero	1° ordem	Higuchi	Baker-Lonsdale
PLA- <i>b</i> -PEG/PVAI	0,372	0,955	0,947	0,983
PLA- <i>b</i> -PEG/SC	0,436	0,990	0,952	0,996

NOTA: PVAL – álcool polivinílico; SC – colato de sódio.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o encapsulamento do POH proposto é uma estratégia viável, proporcionando alta capacidade de encapsulação do fármaco. Uma vez que a taxa de liberação do fármaco foi basicamente determinada pelo tempo de degradação e formação de poros na cápsula polimérica, a taxa de liberação pode ser modulada mudando-se a proporção entre copolímero e POH. O aumento da espessura da cápsula polimérica pode ser obtido pelo aumento da quantidade de copolímero na formulação. Entretanto, uma vez que o POH é líquido e a diferença de densidade contribui para a maior pressão interna, os efeitos significativos no retardo da liberação em função da espessura aumentada podem não ser tão significativos.

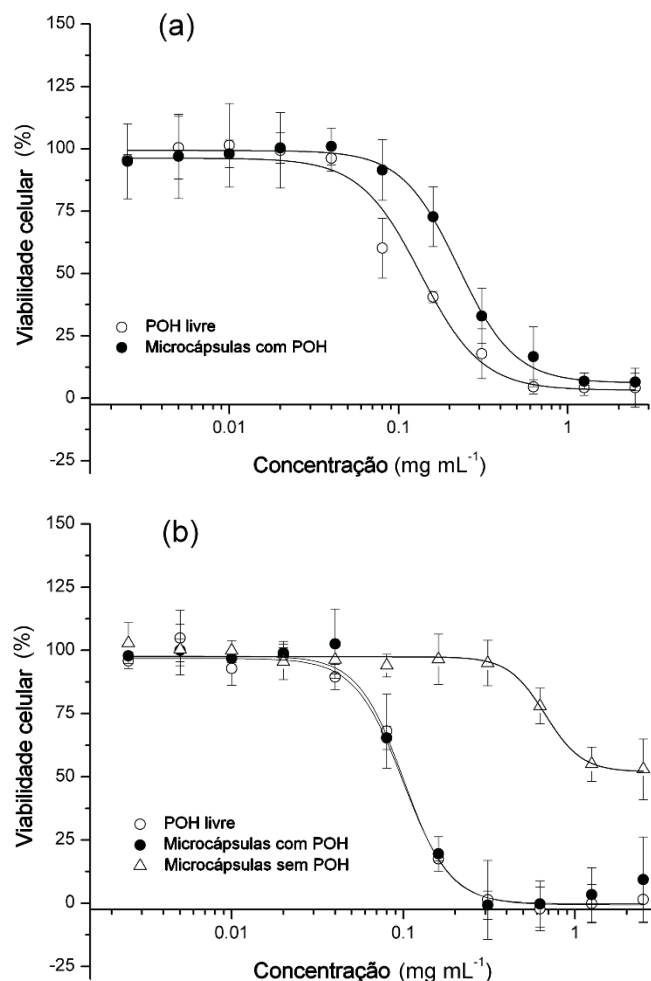
O tamanho estimado para microcápsulas foi de cerca de 2 μm , muito alto para administração intravenosa visando tumores sólidos. Entretanto, tais resultados demonstram que o POH apresenta potencial para estudado em nanoformulações.

5.3.4 Estudos de citotoxicidade das microcápsulas de PLA-*b*-PEG

A citotoxicidade do POH livre, POH encapsulado em microcápsulas e microcápsulas não carregadas com o fármaco foi investigada em fibroblastos de rim embrionário humano não tumorogênico (HEK-293). Optou-se pela avaliação citotóxica das microcápsulas formuladas com colato de sódio a 1,5%, pois os resultados indicaram que a interface foi mais bem organizada com este tensoativo e a esfericidade é mantida após o procedimento de centrifugação. Esta linhagem celular foi escolhida como um sistema inicial para teste, dado a aplicação prévia dessa linhagem na avaliação do potencial efeito citotóxico das nanopartículas (GUAN et al., 2012; SELVARAJ et al., 2014).

Como mostrado na Figura 30, o POH livre e o POH encapsulado induziram a morte celular de uma maneira concentração-dependente. Após 24 h de tratamento, o valor de CI_{50} para POH livre foi de $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o valor de CI_{50} para POH carregado foi quase duas vezes maior, com um valor de $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 30a). Esses resultados estão correlacionados com a liberação gradual do POH. Ao contrário, após 72 h de tratamento, um valor próximo de CI_{50} , isto é, $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi observado para POH livre e POH carregado (Figura 30b). Esses resultados estão correlacionados com a liberação completa do POH. As microcápsulas não carregadas se mostraram não citotóxicas, mesmo em concentrações elevadas como $650 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 30b). Tais resultados demonstraram que o POH apresenta potencial para ser incorporado em nanocápsulas, e diminuir a toxicidade *in vivo* associada à administração intravascular, bem como os efeitos colaterais relatados anteriormente com a administração oral.

FIGURA 30 - PERFIL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* EM CÉLULAS HEK-293 PARA MICROCÁPSULAS COM E SEM ÁLCOOL PERÍLICO E FÁRMACO LIVRE. (a) 24 HORAS DE TRATAMENTO; (b) 72 HORAS DE TRATAMENTO.



NOTA: Círculos brancos – álcool perílico livre; Círculos pretos – microcápsulas com fármaco; Triângulos brancos – microcápsulas sem fármaco.

5.4 Preparação e caracterização das nanopartículas contendo POH

A técnica utilizada para a preparação das nanocápsulas foi a emulsificação-evaporação do solvente, uma vez que se mostrou-se adequada para a encapsulação de compostos lipofílicos e tem sido utilizada com copolímeros como o PLA-*b*-PEG. Além disso, uma vez que nos experimentos para a obtenção de microcápsulas essa técnica se mostrou adequada em termos de EE (%), o procedimento foi ajustado com um aporte de alta energia a fim de diminuir o tamanho das gotículas de emulsão para escala nanométrica. A condição que apresentou melhor redução no tamanho das partículas e menor

polidispersão de tamanho foi a ultrassonicação com uma sonda de titânio e ciclo de um minuto a 20 KHz com 20% de amplitude.

Uma maior reprodutibilidade no procedimento foi observada ao se padronizar a lavagem e enxague das vidrarias com reagentes de alta pureza e secagem em fluxo laminar. Possivelmente, ao se retirar completamente os resíduos de detergentes, gorduras e ao se evitar a deposição de partículas sólidas do ar, influências externas na formação das nanocápsulas foram reduzidas. De igual forma, todos os solventes e soluções utilizadas na formulação foram filtrados em membranas de 0,22 μm de tamanho de poro.

A formulação que apresentou melhor resultado a partir do copolímero PLA-*b*-PEG, foi composta de uma proporção de 25 mg de copolímero para 10 mg de POH, utilizando-se solução de colato de sódio a 1,5% como fase aquosa contendo surfactante. Apesar de ser uma etapa adicional, a pré-emulsificação com vortezização a 2.500 rpm se mostrou adequada, uma vez que contribuiu para a menor polidispersão do tamanho das partículas.

Durante o processo de nanoemulsificação, utilizou-se um banho de gelo para evitar o aquecimento e evaporação parcial do solvente orgânico e do POH (POH, PE = 120°C vs. CHCl_3 , PE = 61°C). A escolha do processo de evaporação por agitação magnética, a uma condição intermediária (300 rpm), por 12 horas possibilitou uma maior EE (%) em relação ao processo de evaporação rotativa a pressão negativa. Por se tratar de nanocápsulas contendo um fármaco líquido, com ponto de ebulição próximo a 120°C, acredita-se que pode ocorrer a possibilidade de co-evaporação com o solvente orgânico. Além disso, esse processo de evaporação já foi relatado na literatura para a nanoencapsulação de compostos voláteis (HOUVENAGEL et al., 2017).

O processo de ultracentrifugação a 14.857 x g por 30 min, a 4°C, se mostrou suficiente para a completa deposição das nanopartículas, permitindo a separação do fármaco encapsulado do não encapsulado. A lavagem por duas vezes com água destilada foi padronizada como forma de separar completamente o fármaco não encapsulado do encapsulado, assim como remover o surfactante da suspensão. Adicionalmente, por se tratar de nanocápsulas contendo um fármaco líquido, optou-se por não liofilizar a formulação para armazenamento.

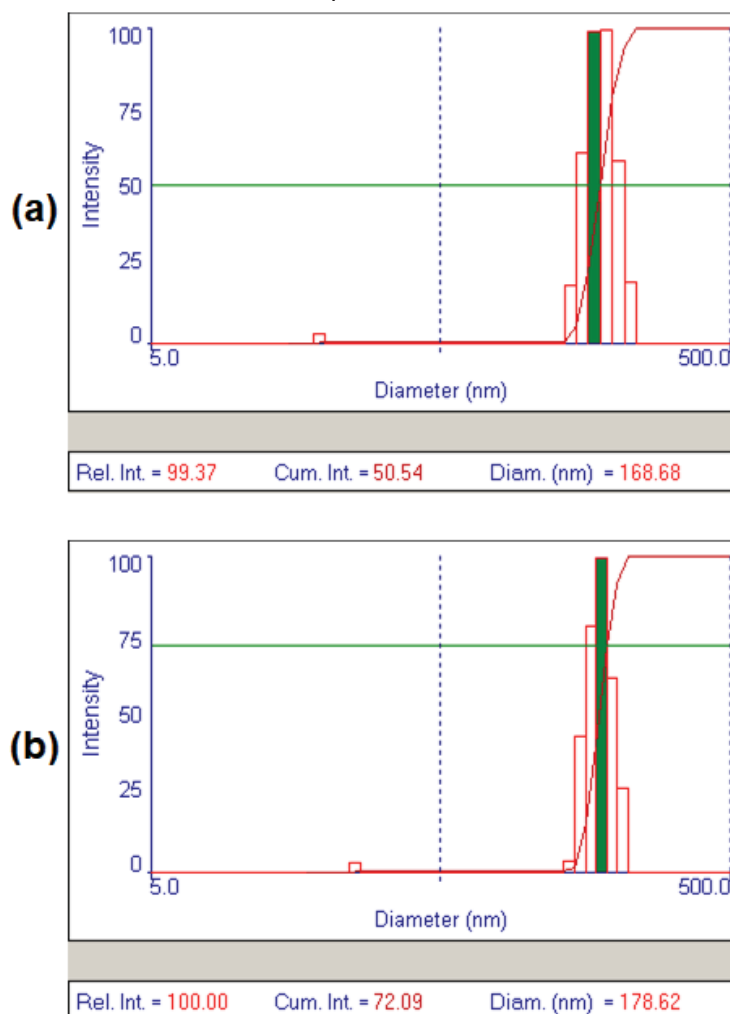
A determinação do tamanho de partícula é um parâmetro crucial, visto que tanto a estabilidade física como os parâmetros *in vivo* podem ser influenciados por essa característica (CHO et al., 2013). Para essa finalidade foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), que considera o diâmetro hidrodinâmico como o tamanho equivalente ao tamanho de uma esfera rígida hipotética, que se difunde de igual forma que as nanocápsulas em análise. Na Tabela 21 são apresentados os dados de diâmetro hidrodinâmico médio e IP, obtidos para as nanocápsulas com e sem POH, antes e após filtração em membranas de poro de 0,45 μm . Pode-se observar que o diâmetro hidrodinâmico médio para as nanocápsulas contendo o POH tiveram um tamanho médio de 170 nm, caracterizando sistemas nanoparticulados eficientes para o carregamento de fármacos com vetorização passiva pelo efeito EPR (KOBAYASHI; BRECHBIEL, 2005). Pela avaliação do IP e pela análise do gráfico da Figura 31, pode-se observar que as nanocápsulas apresentaram um perfil de distribuição estreito e que caracteriza a homogeneidade da suspensão coloidal obtida (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011).

TABELA 21 - VALORES DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLA-*b*-PEG CONTENDO OU NÃO O ÁLCOOL PERÍLICO

Amostras	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) \pm DP	Índice de polidispersão
NC PLA- <i>b</i> -PEG/POH	171,2 \pm 8,6	0,131
NC PLA- <i>b</i> -PEG/POH filtrada	173,9 \pm 7,5	0,134
NC PLA- <i>b</i> -PEG	150,6 \pm 8,9	0,126
NC PLA- <i>b</i> -PEG filtrada	157,1 \pm 11,4	0,133

NOTA: NC – nanocápsula; POH – álcool perílico; Filtrada – filtrada em membrana de 0,45 μm de tamanho de poro; Valores expressos como média aritmética ($n = 3$) e desvio padrão (DP).

FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOCÁPSULAS DE PLA-*B*-PEG CONTENDO O ÁLCOOL PERÍLICO, ANTES (A) E APÓS (B) FILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 0,45 µM DE TAMANHO DE PORO.



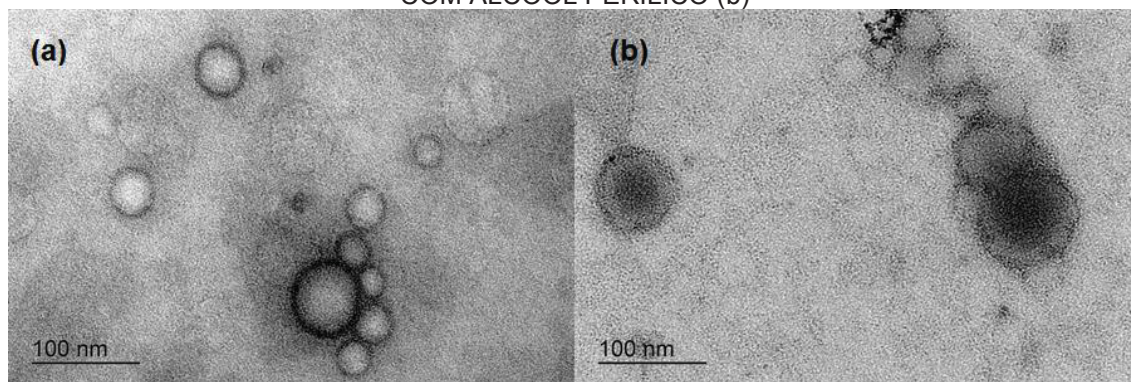
O potencial zeta observado para as nanocápsulas apresentou valores negativos de $-19,6 \pm 0,3$ mV (NC PLA-*b*-PEG sem POH) e $-17,7 \pm 0,6$ mV (NC PLA-*b*-PEG contendo POH), o que é condizente com a natureza dos polímeros. No trabalho proposto por Houvenagel, com um copolímero similar e usando o mesmo surfactante (SC), os resultados observados para o potencial zeta foram de -24 ± 8 mV. O pH das formulações foi de 4,92 e 5,89 para as nanocápsulas contendo o POH e sem POH.

Em geral a estabilidade física de sistemas coloidais é melhorada quando o valor absoluto de potencial zeta é próximo de 30 mV, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função de colisões ocasionais. Valores muito próximo ao neutro favorecem a aglomeração das partículas (NEVES et al., 2013). Adicionalmente à estabilidade física, essa característica

negativa da superfície promove o aumento do seu tempo de permanência no sangue, visto que partículas carregadas positivamente tendem a ser depuradas mais rapidamente e acumuladas nos pulmões e fígado (LI; HUANG, 2008).

Através das análises de microscopia eletrônica obtidas a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas, foi possível visualizar a formação de nanopartículas esféricas. Os resultados observados para tamanho foram similares aos encontrados pelo método de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Não foram verificadas diferenças na morfologia entre as nanocápsulas preparadas com ou sem o POH.

FIGURA 32 - ELETROMICROGRAFIAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA NANOCÁPSULAS DE PLA-*b*-PEG SEM ÁLCOOL PERÍLICO (a) E COM ÁLCOOL PERÍLICO (b)



NOTA: Eletromicrografias com aumento de 50.000 vezes.

As nanocápsulas foram avaliadas quanto à incorporação de POH, através da determinação da EE (%) e capacidade de carregamento de POH por massa de nanopartículas. Os resultados obtidos são resumidos na Tabela 22.

TABELA 22 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E CAPACIDADE DE CARGA DE ÁLCOOL PERÍLICO, POR DETERMINAÇÃO DIRETA E INDIRETA, PARA NANOCÁPSULAS DE PLA-*b*-PEG

Amostra	Eficiência de encapsulação ^a (%) ± DP	Eficiência de encapsulação ^b (%) ± DP	Capacidade de carga (%) ± DP
NC PLA- <i>b</i> -PEG	70,62 ± 1,35	69,75 ± 0,56	28,55 ± 0,54

NOTA: ^a determinação de forma direta; ^b determinação de forma indireta. com resultado estimado na média de 3 lotes; DP – desvio padrão ($n = 3$).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, um protocolo para a síntese e purificação de copolímeros PLA-*b*-PEG e PLA-*b*-PEG-FOLATO, com alto percentual de rendimento e boa conjugação foi desenvolvido. A caracterização copolimérica por diferentes técnicas, tais como RMN de ^1H , GPC, DSC, FTIR e UV-vis, demonstrou grande potencial para uso em nanossistemas, como tamanho aproximado de $20.000 \text{ g mol}^{-1}$ e IP próximo a 1,3.

O método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD para a determinação da EE (%) do POH e caracterização das micro e nanocápsulas, foi desenvolvido e validado de acordo com as normas mais atuais de validação, mostrando-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

A técnica de emulsificação-evaporação de solvente mostrou-se adequada para a microencapsulação do fármaco lipofílico álcool perfílico. Os valores de encapsulação para o POH nas microcápsulas foram ao redor de 65%. Um valor considerado interessante, frente as características da substância. A influência de diferentes concentrações de surfactantes na morfologia, resistência física e liberação do POH foi avaliada por CLSM e outras técnicas. O colato de sódio mostrou-se como um surfactante mais interessante que o álcool polivinílico. A liberação *in vitro* foi correlacionada com modelo cinético de Baker-Lonsdale, relacionado à formação de poros pela degradação polimérica. Adicionalmente, a presença do copolímero não influenciou negativamente na atividade citotóxica do POH.

Nanocápsulas de PLA-*b*-PEG foram obtidas por processo de emulsificação-evaporação de solvente utilizando colato de sódio como surfactante. O percentual de encapsulação do POH foi próximo de 70%. O tamanho médio das nanocápsulas foi de aproximadamente 172 nm, com índice de polidispersão de 0,13 e perfil esférico. A baixa polidispersão demonstra homogeneidade das partículas, que aliado ao baixo tamanho demonstra potencial para bioacumulação por vetorização passiva através do efeito EPR. O pH da suspensão se mostrou adequado para nanosuspensões, com valores de potencial zeta negativos (-18 a -20 mV) sugerindo estabilidade física das nanocápsulas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados demonstraram que o POH tem grande potencial para ser incorporado em sistemas poliméricos biodegradáveis, para melhorar a terapêutica e diminuir a toxicidade *in vivo* associada ao uso oral. Isso também pode contribuir para a bioacumulação e aumento da biodisponibilidade em relação ao fármaco livre por via oral. Portanto, formular e caracterizar nanocápsulas recobertas com folato (PLA-*b*-PEG-FOLATO), contendo POH, e avaliar do potencial de internalização celular em modelos *in vitro* com células que superexpressam receptores parece promissor, bem como comparar a biodisponibilidade relativa através de estudos de pré-farmacocinética *in vivo*, uma vez que o álcool perílico puro tem baixíssima biodisponibilidade.

Diante disso, torna-se interessante: (I) Avaliação do perfil de liberação *in vitro* em meio fisiológico (tampão PBS pH 7,4 – 37°C) e endossomal (Tampão PBS pH 4,5 – 37°C) das nanopartículas poliméricas vetorizadas ativamente; (II) Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* das nanopartículas poliméricas vetorizadas ativamente, através dos ensaios MTT em linhagens celulares tumorais que expressam receptores de folato (MCF-7 – carcinoma de mama; SKOV3 – carcinoma de ovário; HeLa – carcinoma cervical); (III) Avaliação da internalização celular *in vitro* das nanopartículas poliméricas vetorizadas passiva e ativamente, através de microscopia de varredura a laser confocal e citometria de fluxo, em linhagens celulares tumorais que expressão receptores de folato; (IV) Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), para a determinação de POH e seus metabólitos (ácido perílico e ácido dihidroperílico) em plasma de ratos *Wistar*; (V) Determinação do perfil farmacocinético do POH e seus metabólitos (ácido perílico e ácido dihidroperílico) em ratos *Wistar* após a administração intravenosa de álcool perílico puro e nanopartículas poliméricas contendo álcool perílico (vetorizadas passivamente e ativamente); (VI) Avaliação e comparação dos parâmetros farmacocinéticos do fármaco isolado e carregado pelas nanopartículas poliméricas.

REFERENCIAS

- A D'ALESSIO, P. et al. Skin repair properties of d-Limonene and perillyl alcohol in murine models. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)**, v. 13, n. 1, p. 29-35, 2014.
- AHMED, F.; DISCHER, D. E. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. **Journal of controlled release**, v. 96, n. 1, p. 37-53, 2004.
- ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.
- ALIBOLANDI, M. et al. The chemotherapeutic potential of doxorubicin-loaded PEG-b-PLGA nanopolymersomes in mouse breast cancer model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 521-531, 2015.
- ALMEIDA, V. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 53. 2015a.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. Guia nº 04/2015 Versão 01: Guia para a obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. 2015b.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017.
- ARRANJA, A. G. et al. Tumor-targeted nanomedicines for cancer theranostics. **Pharmacological research**, v. 115, p. 87-95, 2017.
- AZZOLI, C. G. et al. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 493-498, 2003.
- BABAN, D. F.; SEYMOUR, L. W. Control of tumour vascular permeability. **Advanced drug delivery reviews**, v. 34, n. 1, p. 109-119, 1998.
- BAILEY, H. H. et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 149, 2008.

BAILEY, H. H. et al. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. **Gynecologic oncology**, v. 85, n. 3, p. 464-468, 2002.

BAILEY, H. H. et al. A phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 368-376, 2004.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, 2016.

BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 129-135, 1998.

BERG, J. C. **An introduction to interfaces & colloids: the bridge to nanoscience**. World Scientific, 2010. ISBN 9814293075.

BHATTACHARYA, A.; RAY, P. Studies on surface tension of poly (vinyl alcohol): effect of concentration, temperature, and addition of chaotropic agents. **Journal of applied polymer science**, v. 93, n. 1, p. 122-130, 2004.

BILATI, U.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67-75, 2005.

BODDU, S. H. et al. Preparation and characterization of folate conjugated nanoparticles of doxorubicin using PLGA-PEG-FOL polymer. **Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 68-75, 2012.

BÖHMER, M. R. et al. Preparation of monodisperse polymer particles and capsules by ink-jet printing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 289, n. 1, p. 96-104, 2006.

BOISSENOT, T. et al. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 136-144, 2016.

BOUAPAO, L. et al. Crystallization, spherulite growth, and structure of blends of crystalline and amorphous poly (lactide) s. **Polymer**, v. 50, n. 16, p. 4007-4017, 2009.

BOURY, F. et al. Dynamic Properties of Poly(DL-lactide) and Polyvinyl Alcohol Monolayers at the Air/Water and Dichloromethane/Water Interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 380-392, 1995.

BRANT, J.; LECOANET, H.; WIESNER, M. R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 7, n. 4-5, p. 545-553, 2005.

BWATANGLANG, I. B. et al. In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 480, p. 146-158, 2016.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615-1626, 2008.

CANELAS, D. A.; HERLIHY, K. P.; DESIMONE, J. M. Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 4, p. 391-404, 2009.

CERDA, S. R. et al. Enhancement of sterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol is unaffected by competitive 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. **Lipids**, v. 34, n. 6, p. 605-615, 1999.

CHEN, J. et al. Biocompatible shaped particles from dried multilayer polymer capsules. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 11, p. 3830-3841, 2013.

CHEN, T. C.; FONSECA, C. O. D.; SCHÖNTHAL, A. H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1580-1593, 2015.

CHENG, L.-C. et al. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells. **Nanoscale**, v. 5, n. 9, p. 3547-3569, 2013.

CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

CHO, H.-Y. et al. Perillyl alcohol for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 11, p. 2462-2472, 2012.

CLARK, S. S. et al. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia**, v. 16, n. 2, p. 213-22, 2002.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 21-23, 2013.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, 2002.

CROWELL, P. L. et al. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. **Biochemical pharmacology**, v. 47, n. 8, p. 1405-1415, 1994.

DA FONSECA, C. O. et al. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. **Surgical neurology**, v. 65 Suppl 1, p. S1:2-1:8; discussion S1:8-1:9, 2006.

DA FONSECA, C. O. et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. **Surgical neurology**, v. 70, n. 3, p. 259-266, 2008.

DA FONSECA, C. O. et al. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 137, n. 2, p. 287-293, 2011.

DA FONSECA, C. O. et al. Long-term outcome in patients with recurrent malignant glioma treated with Perillyl alcohol inhalation. **Anticancer Research**, v. 33, n. 12, p. 5625-5631, 2013.

DA HORA MACHADO, A. E. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

DANHIER, F. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? **Journal of Controlled Release**, v. 244, p. 108-121, 2016.

DE FREITAS, R. A. et al. Stabilization of Water-in-Water Emulsions by Polysaccharide-Coated Protein Particles. **Langmuir**, v. 32, n. 5, p. 1227-1232, 2016.

DECHY-CABARET, O.; MARTIN-VACA, B.; BOURISSOU, D. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. **Chemical reviews**, v. 104, n. 12, p. 6147-6176, 2004.

DEMARQUETTE, N. R.; KAMAL, M. R. Comparação entre o método da gota pendente e o método da gota girante para medida da tensão interfacial entre polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 63-70, 1997.

DIAO, J. et al. PEG–PLA nanoparticles facilitate siRNA knockdown in adult zebrafish heart. **Developmental biology**, v. 406, n. 2, p. 196-202, 2015.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova**, v. 36, n. 10, 2013.

DIOU, O. et al. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-

functionalization on capsule morphology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 170-177, 2014.

DIOU, O. et al. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI. **Biomaterials**, v. 33, n. 22, p. 5593-5602, 2012.

DONG, C.-M. et al. Synthesis of star-shaped poly (ϵ -caprolactone)-b-poly (dl-lactic acid-alt-glycolic acid) with multifunctional initiator and stannous octoate catalyst. **Macromolecules**, v. 34, n. 14, p. 4691-4696, 2001.

DOS SANTOS, H. S.; DE SOUZA CRUZ, W. M. A Terapia NUTRICIONAL COM VITAMINAS ANTIOXIDANTES E O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO ONCOLÓGICO. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-08, 2001.

DU, Y. J. et al. ABA type copolymers of lactide with poly (ethylene glycol). Kinetic, mechanistic, and model studies. **Macromolecules**, v. 28, n. 7, p. 2124-2132, 1995.

DURAN, N.; MORAIS, P. C. D.; MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber, 2006. ISBN 8588098334.

EL-GOGARY, R. I. et al. Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. **ACS nano**, v. 8, n. 2, p. 1384-1401, 2014.

EL-HAMMADI, M. M. et al. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 61-70, 2017.

ELEGBEDE, J. A.; FLORES, R.; WANG, R. C. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. **Life Science**, v. 73, n. 22, p. 2831-40, 2003.

ESMAEILI, F. et al. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA–PEG–folate conjugate. **Journal of drug targeting**, v. 16, n. 5, p. 415-423, 2008.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly (D, L-lactide)(PLA) based nanoparticles. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 96-106, 2010.

FARAZUDDIN, M. et al. Anticancer efficacy of perillyl alcohol-bearing PLGA microparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 35-47, 2012.

FERNANDES, J. et al. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. **Oncology reports**, v. 13, n. 5, p. 943-7, 2005.

FORSTER, J. C. et al. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. **Hypoxia**, v. 5, p. 21, 2017.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. **International journal of pharmaceuticals**, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, 2011.

FREIRE, M. G. et al. Surface tension of liquid fluorocompounds. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 5, p. 1820-1824, 2006.

GELB, M. H. et al. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 91, n. 2, p. 169-75, 1995.

GHOSH CHAUDHURI, R.; PARIA, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **Chemical reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2011.

GOURDON, B. et al. Functionalized PLA-PEG nanoparticles targeting intestinal transporter PepT1 for oral delivery of acyclovir. **International journal of pharmaceuticals**, v. 529, n. 1-2, p. 357-370, 2017.

GRAF, R. et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, n. 3-4, p. 301-313, 2000.

GU, Y. et al. Comparison of HPLC with electrochemical detection and LC-MS/MS for the separation and validation of artesunate and dihydroartemisinin in animal and human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 213-218, 2008.

GUAN, R. et al. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 602, 2012.

GUILLARME, D. et al. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1069-1082, 2010.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and original investigations*, 2008, Elsevier. p.57-64.

HAMI, Z. et al. Synthesis and in vitro evaluation of a pH-sensitive PLA-PEG-folate based polymeric micelle for controlled delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 309-317, 2014.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Pharmacokinetic consequences of pegylation. **Drug delivery**, v. 13, n. 6, p. 399-409, 2006.

HEO, D. S. et al. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 50, n. 12, p. 3681-90, 1990.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013. ISBN 0123822408.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, 1998.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 132, n. 3, p. 153-163, 2008.

HOLSTEIN, S. A.; HOHL, R. J. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 6, p. 1209-15, 2003.

HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 1, p. 89-96, 2008.

HOUVENAGEL, S. et al. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 16, p. 2559-2570, 2017.

HU, K. et al. Lactoferrin-conjugated PEG–PLA nanoparticles with improved brain delivery: in vitro and in vivo evaluations. **Journal of controlled release**, v. 134, n. 1, p. 55-61, 2009.

HU, X. et al. Targeting and anti-tumor effect of folic acid-labeled polymer–doxorubicin conjugates with pH-sensitive hydrazone linker. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 26, p. 13303-13310, 2012.

HU, Y. et al. Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: Focus on poly (lactic acid). **Materials**, v. 9, n. 3, p. 133, 2016.

HUANG, C.-Y. et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. **Biomedicine**, v. 7, n. 4, 2017.

HUDES, G. R. et al. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. **Clinical cancer research**, v. 6, n. 8, p. 3071-3080, 2000.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. In: (Ed.). **Nanomedicine in Cancer**: Pan Stanford, 2017. p.47-72.

HYON, S.-H.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y. Synthesis of polylactides with different molecular weights. **Biomaterials**, v. 18, n. 22, p. 1503-1508, 1997.

ICH. Q1A (R2), Stability testing of new drug substances and products. International Conference on Harmonization, 2003, International Conference on Harmonization Geneva.

ICH. ICH Harmonised tripartite guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2005.

ICH. Q3A (R2): Impurities in new drug substances. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). 2006.

INCA. 2019. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em: 30/03/2019.

JACOBSEN, S. et al. Polylactide (PLA)—a new way of production. **Polymer Engineering & Science**, v. 39, n. 7, p. 1311-1319, 1999.

JAIN, R. K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 353-365, 2012.

JOKERST, J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 715-28, 2011.

KALIA, J.; RAINES, R. T. Advances in bioconjugation. **Current organic chemistry**, v. 14, n. 2, p. 138-147, 2010.

KAMALY, N. et al. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

KARLSSON, J.; VAUGHAN, H. J.; GREEN, J. J. Biodegradable polymeric nanoparticles for therapeutic cancer treatments. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 9, p. 105-127, 2018.

KIM, K. S. et al. Crystallization behavior of biodegradable amphiphilic poly (ethylene glycol)-poly (L-lactide) block copolymers. **Journal of applied polymer science**, v. 72, n. 3, p. 341-348, 1999.

KNOP, K. et al. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. **Angewandte chemie international edition**, v. 49, n. 36, p. 6288-6308, 2010.

KOBAYASHI, H.; BRECHBIEL, M. W. Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 15, p. 2271-2286, 2005.

KOBAYASHI, H. et al. The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points. **Cancer research**, v. 59, n. 2, p. 422-430, 1999.

KOBAYASHI, H.; WATANABE, R.; CHOYKE, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? **Theranostics**, v. 4, n. 1, p. 81, 2014.

KOWALSKI, A.; DUDA, A.; PENCZEK, S. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin (II) octoate. 3. Polymerization of L, L-dilactide. **Macromolecules**, v. 33, n. 20, p. 7359-7370, 2000.

KRICHELDORF, H. R. Syntheses and application of polylactides. **Chemosphere**, v. 43, n. 1, p. 49-54, 2001.

KRICHELDORF, H. R.; BERL, M.; SCHARNAGL, N. Poly (lactones). 9. Polymerization mechanism of metal alkoxide initiated polymerizations of lactide and various lactones. **Macromolecules**, v. 21, n. 2, p. 286-293, 1988.

KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I.; BOETTCHER, C. Polylactones: 31. Sn (II) octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study. **Polymer**, v. 36, n. 6, p. 1253-1259, 1995.

KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I.; STRICKER, A. Polylactones 48. SnOct₂-initiated polymerizations of lactide: a mechanistic study. **Macromolecules**, v. 33, n. 3, p. 702-709, 2000.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F. et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 12, p. 5317-5324, 2005.

KULKARNI, S. A.; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 10, p. 2512-2522, 2013.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. In: (Ed.). **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**: Elsevier, 2017. p.43-58.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LACAVA, J. et al. On the behaviour of nanoparticles in oil-in-water emulsions with different surfactants. **Soft Matter**, v. 10, n. 11, p. 1696-1704, 2014.

LEE, K.-Y.; CHIU, Y.-T.; LO, C.-L. Preparation and characterization of potential doxorubicin-loaded mixed micelles formed from vitamin E containing graft copolymers and PEG-b-PLA diblock copolymers. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83825-83836, 2015.

LEE, W.-K. et al. Synthesis and Surface Properties of Fluorocarbon End-Capped Biodegradable Polyesters. **Macromolecules**, v. 34, n. 9, p. 3000-3006, 2001.

LI, S.-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.

LIU, G. et al. Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer. **Investigational new drugs**, v. 21, n. 3, p. 367-372, 2003.

LODGE, T. P.; PUDIL, B.; HANLEY, K. J. The full phase behavior for block copolymers in solvents of varying selectivity. **Macromolecules**, v. 35, n. 12, p. 4707-4717, 2002.

LÖFGREN, A. et al. Recent advances in ring-opening polymerization of lactones and related compounds. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, v. 35, n. 3, p. 379-418, 1995.

LOUTRARI, H. et al. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 2, p. 568-575, 2004.

LU, X.-Y. et al. Polymer nanoparticles. In: (Ed.). **Progress in molecular biology and translational science**: Elsevier, v.104, 2011. p.299-323. ISBN 1877-1173.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advances in enzyme regulation**, 2001.

MAEDA, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. **Bioconjugate chemistry**, v. 21, n. 5, p. 797-802, 2010.

MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 91, p. 3-6, 2015.

MAEDA, H.; BHARATE, G.; DARUWALLA, J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals**, v. 71, n. 3, p. 409-419, 2009.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 71-79, 2013.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of controlled release**, v. 65, n. 1-2, p. 271-284, 2000.

MAINARDES, R. M. et al. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 1, p. 257-267, 2009.

MANCHANDA, R. et al. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 260-267, 2010.

MARTINS, I. M. et al. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191-200, 2014.

MASUTANI, K.; KIMURA, Y. PLA synthesis. From the monomer to the polymer. Poly (lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications. **R. Soc. Chem.**, p. 1-36, 2015.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.

MEADOWS, S. M. et al. Phase II trial of perillyl alcohol in patients with metastatic colorectal cancer. **International journal of gastrointestinal cancer**, v. 32, n. 2-3, p. 125-128, 2002.

MENON, J. U. et al. Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. **Journal of biomedical materials research A**, v. 100, n. 8, p. 1998-2005, 2012.

MEUNIER, M.; GOUPIL, A.; LIENARD, P. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles. **International journal of pharmacy**, v. 526, n. 1-2, p. 157-166, 2017.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in lipid research**, v. 42, n. 6, p. 463-478, 2003.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MORGAN-MEADOWS, S. et al. Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily continuously. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 52, n. 5, p. 361-366, 2003.

MUELLER, R. H. et al. In vitro characterization of poly (methyl-methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. **Journal of controlled release**, v. 20, n. 3, p. 237-246, 1992.

MURREN, J. R. et al. Phase I study of perillyl alcohol in patients with refractory malignancies. **Cancer biology & therapy**, v. 1, n. 2, p. 130-135, 2002.

NAKADA, M. et al. Molecular targets of glioma invasion. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 4, p. 458, 2007.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123-130, 1995.

NASIR, A.; KAUSAR, A.; YOUNUS, A. A review on preparation, properties and applications of polymeric nanoparticle-based materials. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 4, p. 325-341, 2015.

NEVES, A. R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 177, 2013.

NICOLAS, J. et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1147-1235, 2013.

NIE, Y. et al. Synthesis, characterization and transfection of a novel folate-targeted multipolymeric nanoparticles for gene delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 9, p. 1849-1857, 2009.

NIH. Cancer Treatment. 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> >. Acesso em: 30/03/2019.

NIJENHUIS, A.; GRIJPMAN, D.; PENNING, A. Lewis acid catalyzed polymerization of L-lactide. Kinetics and mechanism of the bulk polymerization. **Macromolecules**, v. 25, n. 24, p. 6419-6424, 1992.

NOBS, L. et al. Surface modification of poly (lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. **International journal of pharmaceuticals**, v. 250, n. 2, p. 327-337, 2003.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997.

ODA, T.; MAEDA, H. Binding to and internalization by cultured cells of neocarzinostatin and enhancement of its actions by conjugation with lipophilic

styrene-maleic acid copolymer. **Cancer research**, v. 47, n. 12, p. 3206-3211, 1987.

ODA, T.; MORINAGA, T.; MAEDA, H. Stimulation of macrophage by polyanions and its conjugated proteins and effect on cell membrane. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 181, n. 1, p. 9-17, 1986.

OGAWA, M. et al. New nanosized biocompatible MR contrast agents based on lysine-dendri-graft macromolecules. **Bioconjugate chemistry**, v. 21, n. 5, p. 955-960, 2010.

OUHADI, T.; STEVENS, C.; TEYSSIÉ, P. Mechanism of ϵ -Caprolactone polymerization by Aluminum Alkoxides. **Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 1, n. S19751, p. 191-201, 1975.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D. Novel self-assembled core-shell nanoparticles based on crystalline amorphous moieties of aliphatic copolyesters for efficient controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 2, p. 177-184, 2009.

PHAN, Q. T. et al. Characteristics and cytotoxicity of folate-modified curcumin-loaded PLA-PEG micellar nano systems with various PLA: PEG ratios. **International journal of pharmaceutics**, v. 507, n. 1-2, p. 32-40, 2016.

PISANI, E. et al. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. **Journal of colloid and interface science**, v. 326, n. 1, p. 66-71, 2008.

POWERS, K. W. et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 296-303, 2006.

PROIKAKIS, C.; TARANTILI, P.; ANDREOPOULOS, A. Synthesis and characterization of low molecular weight polylactic acid. **Journal of Elastomers & Plastics**, v. 34, n. 1, p. 49-63, 2002.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAMAZANI, F. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, n. 1, p. 358-367, 2016.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RILEY, T. et al. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from Poly (lactic acid)- Poly (ethylene glycol)(PLA- PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. **Langmuir**, v. 17, n. 11, p. 3168-3174, 2001.

RIPPLE, G. H. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 390-396, 2000.

RIPPLE, G. H. et al. Phase I clinical trial of perillyl alcohol administered daily. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 1159-1164, 1998.

ROSENBLUM, D. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1410, 2018.

RUOZI, B. et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 557, 2011.

RYNER, M. et al. Mechanism of ring-opening polymerization of 1, 5-dioxepan-2-one and L-lactide with stannous 2-ethylhexanoate. A theoretical study. **Macromolecules**, v. 34, n. 12, p. 3877-3881, 2001.

SAWALHA, H.; SCHROEN, K.; BOOM, R. Biodegradable polymeric microcapsules: Preparation and properties. **Chemical engineering journal**, v. 169, n. 1-3, p. 1-10, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. v. 26, n. 5, 2003.

SCHWACH, G. et al. More about the polymerization of lactides in the presence of stannous octoate. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 35, n. 16, p. 3431-3440, 1997.

SELVARAJ, V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity caused by yttrium oxide nanoparticles in HEK293 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1379-1391, 2014.

SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20, 2017.

SHIN, H. C. et al. A 3-in-1 polymeric micelle nanocontainer for poorly water-soluble drugs. **Molecular pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1257-65, 2011.

SINGH, R. et al. Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 41, n. 11, p. 1888-1901, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Cengage learning, 2017. ISBN 1305577213.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 48, n. 3, p. 416-427, 2013.

SU, M. et al. Effects of interfacial tension on formation of poly(ethylene oxide)-block-polystyrene micelles from emulsions. **RSC Advances**, v. 5, n. 6, p. 4350-4354, 2015.

SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced drug delivery reviews**, v. 41, n. 2, p. 147-162, 2000.

SUDIMACK MOSELEY, J. J. **Targeted drug delivery via the folate receptor**. - The Ohio State University 2002.

TOBIO, M. et al. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 2, p. 270-275, 1998.

TOBIO, M. et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, n. 3-4, p. 315-323, 2000.

TRAN, S. et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and translational medicine**, v. 6, n. 1, p. 44, 2017.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010.

VAN VLERKEN, L. E.; VYAS, T. K.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 8, p. 1405-14, 2007.

WANG, R. et al. Biological characterization of folate-decorated biodegradable polymer-platinum (II) complex micelles. **Molecular pharmaceuticals**, v. 9, n. 11, p. 3200-3208, 2012.

WANG, S. et al. Synthesis, purification, and tumor cell uptake of ⁶⁷Ga-deferoxamine- folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging. **Bioconjugate chemistry**, v. 7, n. 1, p. 56-62, 1996.

WANG, S. et al. Design and synthesis of [¹¹¹In] DTPA– folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical. **Bioconjugate chemistry**, v. 8, n. 5, p. 673-679, 1997.

WANG, S. et al. Dodecanol-poly (D, L-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol)-folate (Dol-PLA-PEG-FA) nanoparticles: evaluation of cell cytotoxicity and selecting capability in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 130-135, 2013.

WANG, S. et al. PLA-PEG-FA NPs for drug delivery system: Evaluation of carrier micro-structure, degradation and size-cell proliferation relationship. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 297-302, 2018.

WATANABE, T. et al. Indocyanine green-laden poly (ethylene glycol)-block-poly lactide (PEG-b-PLA) nanocapsules incorporating reverse micelles: effects of PEG-b-PLA composition on the nanocapsule diameter and encapsulation efficiency. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 520, p. 764-770, 2017.

WHO. Cancer. 12 September 2018 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 30/03/2019.

WIDEGREN, J.; BERGSTRÖM, L. Electrostatic stabilization of ultrafine titania in ethanol. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 85, n. 3, p. 523-528, 2002.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International journal of pharmacy**, v. 364, n. 2, p. 298-327, 2008.

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1163-70, 2007.

WORKMAN, P.; KAYE, S. B. Translating basic cancer research into new cancer therapeutics. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 4, p. S1-S9, 2002.

XIE, X. et al. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3827, 2017.

XU, G. et al. Synthesis and Hydrophilic Performance of Poly (Lactic Acid)-Poly (Ethylene Glycol) Block Copolymers. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, n. 03, p. 299, 2016.

XU, M. et al. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 195, n. 2, p. 232-46, 2004.

YAN, S. et al. Layer-by-layer assembly of poly(L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for high loading and sustained release of 5-fluorouracil. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 78, n. 3, p. 336-45, 2011.

YERUVA, L. et al. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 257, n. 2, p. 216-26, 2007.

YOO, H. S.; PARK, T. G. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. **Journal of controlled release**, v. 100, n. 2, p. 247-256, 2004a.

YOO, H. S.; PARK, T. G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. **Journal of controlled release**, v. 96, n. 2, p. 273-283, 2004b.

YUAN, W. et al. Behavior of Gradient Copolymers at Liquid/Liquid Interfaces. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3261-3267, 2010.

ZARBIN, A. J. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469, 2007.

ZHANG, X. et al. Mechanism of lactide polymerization in the presence of stannous octoate: the effect of hydroxy and carboxylic acid substances. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 32, n. 15, p. 2965-2970, 1994.

ZHANG, Y.; HUANG, Y.; LI, S. Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 15, n. 4, p. 862-871, 2014.

ZHANG, Z. et al. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205-218, 2013.

ZHAO, F. et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. **Small**, v. 7, n. 10, p. 1322-1337, 2011.

ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3319-3329, 2016.